

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΟΦΑΝΙΔΟΥ ΔΗΜΗΤΡΑ

Επίδραση φυτικών πολυφαινολών και εκχυλισμάτων ελληνικών
ποικιλιών αμπέλου *Μανδηλαριάς Σαντορίνης* και *Ασσύρτικου Σαντορίνης*
στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα
Salmonella typhimurium TA102.

ΛΑΡΙΣΑ - 2004

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΟΦΑΝΙΔΟΥ ΔΗΜΗΤΡΑ

Επίδραση φυτικών πολυφαινολών και εκχυλισμάτων ελληνικών
ποικιλιών αμπέλου *Μανδηλαριάς Σαντορίνης* και *Ασσύρτικου Σαντορίνης*
στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα
Salmonella typhimurium TA102.

ΛΑΡΙΣΑ - 2004



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 4068/1

Ημερ. Εισ.: 04-11-2004

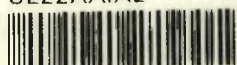
Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2004

ΘΕΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000075129

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- **ΖΗΣΗΣ ΜΑΜΟΥΡΗΣ – ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**
- **ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΟΥΡΕΤΑΣ – ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**
- **ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΟΜΙΩΤΗΣ – ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον κ. Δημήτριο Κουρέτα που αποτέλεσε τον αρχικό εμπνευστή της επιθυμίας μου να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα της διπλωματικής εργασίας, για την ανάθεση του θέματος της πτυχιακής μου, την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, καθώς και για την καθοδήγηση, το ενδιαφέρον, την πείρα και τις γνώσεις που μου μετάδωσε.

Θερμά ευχαριστώ τον κ. Δημήτριο Στάγκο για τη συνεχή ενθάρρυνση και καθοδήγηση, το ενδιαφέρον, την αμέριστη συμπαράσταση, τις γνώσεις, τη στήριξη και τη βοήθεια που απλόχερα μου προσέφερε καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους καθηγητές κ. Ηλία Γούναρη και κ. Γιώργο Πανουτσόπουλο για τη στήριξη και συμπαράστασή τους, καθώς και στη συμφοιτήτριά μου Γεωργία Κακαλοπούλου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας σε όλη τη διάρκεια, από τη κατάθεση μέχρι την ολοκλήρωση της εργασίας.

Περιεχόμενα:

1. Εισαγωγή.	Σελ. 5
1.1.1. Περίληψη.	Σελ. 5
1.1.2. Συντομογραφίες.	Σελ. 5
1.1.3. Γενικά.	Σελ. 6
1.2. Χημική σύσταση του κρασιού.	Σελ. 6
1.3. Χημική δομή των φυτικών πολυφαινολών.	Σελ. 7
1.3.1. Χημική δομή των φλαβονοειδών.	Σελ. 7
1.3.2. Χημική δομή των φαινολικών οξέων.	Σελ. 8
1.3.3. Χημική δομή των στυλβενίων.	Σελ. 8
1.4. Βιοσύνθεση των φυτικών πολυφαινολών.	Σελ.13
1.5. Βιοδιαθεσιμότητα και μεταβολισμός των φυτικών πολυφαινολών.	Σελ.15
1.6. Βιολογική δράση των φυτικών πολυφαινολών.	Σελ.18
1.6.1. Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες.	Σελ.18
1.6.2. Αντιοξειδωτική δράση των φυτικών πολυφαινολών.	Σελ.20
1.6.2.1. Συσχέτιση δομής και αντιοξειδωτικής δράσης των φυτικών πολυφαινολών.	Σελ.23
1.6.3. Προοξειδωτική δράση των φυτικών πολυφαινολών.	Σελ.27
1.6.4. Αντιμεταλλαξιγόνος δράση των φυτικών πολυφαινολών.	Σελ.30
1.7. Κερκετίνη.	Σελ.31
1.8. Κατεχίνη - Επικατεχίνη.	Σελ.31
1.9. Ρεσβερατρόλη.	Σελ.32
1.10. Ελλαγικό οξύ.	Σελ.33
1.11. Μπλεομυκίνη.	Σελ.35
1.12. Σκοπός του πειράματος.	Σελ.37
2. Υλικά και Μέθοδοι.	Σελ.38
2.1. Υλικά.	Σελ.38
2.2. Μέθοδοι.	Σελ.38
2.2.1.α. Γενικά.	Σελ.38
2.2.1.β. Καλλιεργητικά υλικά και χημικά αντιδραστήρια.	Σελ.40
2.2.1.γ. Πειραματική διαδικασία.	Σελ.40
3. Αποτελέσματα.	Σελ.44
3.1. Επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	Σελ.44
3.2. Επίδραση των διαλυτών στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	Σελ.44
3.3. Επίδραση των εξεταζόμενων ουσιών στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	Σελ.44
4. Συζήτηση.	Σελ.74
5. Βιβλιογραφία.	Σελ.78

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.1. Περίληψη.

Το ενδιαφέρον για τη μελέτη της δράσης συγκεκριμένων πολυφαινόλων των σταφυλίων διαρκώς αυξάνει, λόγω της συνεχούς ανακάλυψης ποικίλων πιθανών οφελών τους στην ανθρώπινη υγεία. Οι πολυφαινόλες μπορούν να παρεμβαίνουν σε αρκετά από τα στάδια που οδηγούν στην ανάπτυξη των κακοηθών όγκων, παρουσιάζοντας αντικαρκινογόνες και αντιμεταλλαξιγόνες επιδράσεις. Πρόσφατες μελέτες έχουν επιδείξει ότι εκχυλίσματα σταφυλίων ανέστειλαν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων του μαστού, του πνεύμονα και του εντέρου. Η δυνατότητα αυτή των εκχυλισμάτων αποδίδεται σε φυτικές πολυφαινόλες που περιέχονται στα σταφύλια. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανακάλυψη πιθανών μηχανισμών στους οποίους οφείλεται η χημειοπροστατευτική και αντικαρκινογόνος δράση των εκχυλισμάτων των σταφυλίων και των φυτικών πολυφαινόλων που περιέχουν. Για την επίτευξη του παραπάνω στόχου, εξετάστηκε η επίδραση μεθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων των ελληνικών ποικιλιών αμπέλου *Ασσύρτικου Σαντορίνης* (άσπρα σταφύλια) και *Μανδηλαριάς Σαντορίνης* (κόκκινα σταφύλια), των κλασμάτων της ποικιλίας *Μανδηλαριά Σαντορίνης* και πέντε πολυφαινόλων που συναντώνται σε αφθονία στα σταφύλια (κερκετίνη, κατεχίνη, επικατεχίνη, ρεσβερατρόλη και ελλαγικό οξύ), στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Τα εκχυλίσματα παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση, πιθανώς μέσω της δέσμευσης σιδήρου, αναστέλλοντας τη δράση της μπλεομυκίνης, ενώ τα κλάσματα των ποικιλιών και οι καθαρές πολυφαινόλες κερκετίνη και ρεσβερατρόλη παρουσίασαν προοξειδωτική δράση επάγοντας τη δράση της μπλεομυκίνης. Αυτή η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων θα μπορούσε να είναι ένας ακόμη μηχανισμός με τον οποίο τα εκχυλίσματα σταφυλίων ασκούν τις χημειοπροστατευτικές ιδιότητές τους. Επίσης, η προοξειδωτική δράση των εμπλουτισμένων σε πολυφαινόλες κλασμάτων και των καθαρών πολυφαινόλων θα μπορούσε να εξηγήσει αναφερόμενες κυτταροτοξικές και αποπτωτικές επιδράσεις των φυτικών πολυφαινόλων σε καρκινικά κύτταρα.

1.1.2. Συντομογραφίες.

EtOAc: κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα.

GSH: ανηγμένο γλουταθείο.

LDL: λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας.

LPO: λιπιδιακή υπεροξειδωση.

NADH: νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (ανηγμένη μορφή).

RNS: ενεργές ρίζες αζώτου.

ROS: ενεργές ρίζες οξυγόνου.

1.1.2. Γενικά.

Το κρασί είναι μέρος του ανθρώπινου πολιτισμού εδώ και 6.000 έτη, εξυπηρετώντας διαιτητικές και κοινωνικό-θρησκευτικές λειτουργίες. Τα πρώτα στοιχεία που πιστοποιούν την ύπαρξή του χρονολογούνται μεταξύ 5400 και 5000 π.Χ. Μερικοί ερευνητές τοποθετούν την ανακάλυψη της οινοποίησης, ή τουλάχιστον την ανάπτυξή της, στο νότιο Καύκασο. Θεωρείται επίσης, ότι αρχικά σε αυτή την περιοχή, εμφανίστηκε η εξοικείωση των ανθρώπων με το κρασί της ποικιλίας σταφυλιού *Vitis vinifera*, η οποία στη συνέχεια διαδόθηκε και χρησιμοποιούνταν από τη δυτική οινοποιία. Η παραγωγή του κρασιού πραγματοποιείται σε κάθε ήπειρο και η χημική του σύνθεσή επηρεάζεται από τις τεχνικές οινοποίησης, την ποικιλία σταφυλιών από την οποία προέρχεται και από τους κλιματολογικούς παράγοντες (George J. Soleas et al., 1997).

Οι επιπτώσεις του κρασιού στην υγεία είναι αντικείμενο συζήτησης και διαφωνιών εδώ και αιώνες. Το κρασί θεωρείται ως τονωτικό, διεγερτικό ακόμη και ως αναλγητικό για πολλούς από τους πόνους του σώματος, αλλά και ως προϊόν που προκαλεί σοβαρές διαταραχές όπως είναι το σύνδρομο-Wernicke Korsakov, η καρδιομυοπάθεια, η κίρρωση του ήπατος και μερικές μορφές καρκίνου. Επιπρόσθετη αφορμή για προβληματισμούς δόθηκε το 1970, όπου τα αποτελέσματα ευρείας κλίμακας μελετών έδειχναν ότι οι άντρες και οι γυναίκες που κατανάλωναν μέτριες ποσότητες αλκοόλ είχαν λιγότερες πιθανότητες να πεθάνουν από καρδιακή προσβολή, σε σχέση με άτομα που δεν έπιναν (A. van de Wiel, et al., 2001).

Το 1992, οι S. Renaud και M. De Lorgeril σε μια από τις πιο γνωστές μελέτες, προτείνουν μια εξήγηση ενός φαινομένου που παρατηρείται στο γαλλικό πληθυσμό όσον αφορά την καρδιαγγειακή πάθηση, γνωστό ως "γαλλικό παράδοξο", το οποίο αρχικά περιγράφηκε γύρω στο 1987. Σύμφωνα με αποτελέσματα ενός προγράμματος, που οργανώθηκε το 1989 από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), επιβεβαιώθηκε ότι τα επίπεδα θνησιμότητας που προκαλούνται από τη στεφανιαία νόσο είναι πολύ χαμηλότερα στη Γαλλία απ'ό,τι σε άλλες βιομηχανικές χώρες, ενώ η κατανάλωση κορεσμένων λιπών στη χώρα αυτή είναι σχεδόν η ίδια και τα επίπεδα χοληστερόλης αίματος είναι γενικά πιο υψηλά. Επιπλέον, άλλοι παράγοντες που συνδέονται με τον κίνδυνο της στεφανιαίας νόσου, όπως η αρτηριακή πίεση, το σωματικό βάρος και το κάπνισμα, δεν είναι χαμηλότεροι στη Γαλλία απ'ό,τι στις άλλες χώρες. Οι παρατηρήσεις αυτές συνθέτουν το "γαλλικό παράδοξο" (Pierre-Louis Teissedre and Nicolas Landrault, 2000).

Με τη χρησιμοποίηση πολυπαραγοντικής ανάλυσης, αποκαλύφθηκε ότι σε 17 χώρες που καταναλώνουν κρασί, ο μόνος διαιτητικός παράγοντας που συσχετίζεται σημαντικά με τη θνησιμότητα από τη στεφανιαία νόσο, εκτός από τα γαλακτοκομικά λίπη, ήταν το κρασί. Συγκεκριμένα, η κατανάλωση κρασιού είχε έναν αρνητικό συντελεστή συσχέτισης, που επιδείκνυε μια προστατευτική επίδραση. Έτσι συνειδητοποιήθηκε ότι το φαινόμενο αυτό που παρατηρείται στο γαλλικό πληθυσμό δεν ήταν παράδοξο, εφόσον ληφθεί υπόψη η κατανάλωση κρασιού. Σε αυτήν την μελέτη, η προστασία που οφείλεται στην κατανάλωση κρασιού ανιχνεύθηκε επίσης στην Ελβετία και σε άλλες βιομηχανικές χώρες. Από το γεγονός αυτό και μετά, η προσοχή στράφηκε στα μη οινοπνευματώχα συστατικά του κρασιού (Pierre-Louis Teissedre and Nicolas Landrault, 2000).

1.2. Χημική σύσταση του κρασιού.

Η γνώση της χημικής σύνθεσης του σταφυλιού και του κρασιού έχει επεκταθεί πολύ τα τελευταία 30 με 40 χρόνια. Αν και σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί, ένα μεγάλο μέρος της σύστασης αποτελεί ακόμα μυστήριο (George J. Soleas et al., 1997). Το κρασί περιέχει περισσότερες από 500 ενώσεις, μερικές από τις οποίες προέρχονται από τα σταφύλια, ενώ άλλες αποτελούν μεταβολικά υποπροϊόντα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Οι περισσότερες από τις ενώσεις είναι παρούσες σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, αλλά μερικές εμφανίζονται σε συγκεντρώσεις πάνω από 100 mg/l. Στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν το ύδωρ, οι αλκοόλες, τα οργανικά οξέα, τα σάκχαρα, και τη γλυκερόλη. Η σημαντικότερη αλκόλη στο κρασί είναι αιθανόλη, με τις συγκεντρώσεις που

κυμαίνονται από 10 ως 14%. Η αιθανόλη είναι κρίσιμη για τη σταθερότητα, την ωρίμανση, τις ιδιότητες του κρασιού που σχετίζονται με τη γεύση και το άρωμα, καθώς και για την εξαγωγή των χρωστικών ουσιών και των τανινών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης της φλούδας και του σπόρου των σταφυλιών (A. van de Wiel et al., 2001).

Μια μεγάλη και σύνθετη ομάδα ενώσεων με ιδιαίτερη συνεισφορά στα χαρακτηριστικά και την ποιότητα, κυρίως των κόκκινων κρασιών, είναι οι πολυφαινόλες. Η συγκέντρωσή τους στο άσπρο κρασί είναι πολύ χαμηλότερη από ότι στο κόκκινο. Οι πολυφαινόλες μπορούν να έχουν επιπτώσεις στην εμφάνιση, στη γεύση, στο άρωμα, και τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του κρασιού. Μπορούν να προέλθουν από τα σταφύλια (δέρματα και σπόροι) και τους μίσχους των αμπέλων, ή να παραχθούν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, ή να εξαχθούν από την ξύλινη βυτιοποιία (George J. Soleas et al., 1997).

1.3. Χημική δομή των φυτικών πολυφαινολών.

1.3.1 Χημική δομή φλαβονοειδών.

Οι βιοχημικοί ρόλοι των φλαβονοειδών και των μεταβολιτών τους εξαρτώνται από τη χημική τους δομή και τον σχετικό προσανατολισμό των διάφορων υποκαταστατών στο μόριο. Τα φλαβονοειδή ταξινομούνται ανάλογα με τη χημική τους δομή. Οι κυριότερες κλάσεις των φλαβονοειδών είναι οι φλαβονόλες, οι φλαβόνες, οι φλαβονόνες, οι κατεχίνες (ή φλαβανόλες), οι ανθοκυανιδίνες, οι ισοφλαβόνες, οι διυδρόφλαβονόλες και χαλκόνες (εικόνα 3). Η εικόνα 2 δείχνει τη γενική δομή των φλαβονοειδών και το αριθμητικό σύστημα που χρησιμοποιείται για την διάκριση των ανθρακικών θέσεων γύρω από το μόριο. Οι τρεις φαινολικοί δακτύλιοι αναφέρονται ως A, B, και Γ πυρανικοί δακτύλιοι. (Cook and Samman, 1995).

Τα διαιτητικά φλαβονοειδή διαφέρουν στην τοποθέτηση των υδροξυλικών, μεθοξυλικών, και γλυκοσιδικών πλευρικών ομάδων καθώς και στην κλίση μεταξύ των A και B δακτυλίων. Κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού ομάδες υδροξυλίου προστίθενται, μεθυλιώνονται, σουλφυλιώνονται ή γλυκοσυλιώνονται (Heim et al., 2002).

Τα κυριότερα διαιτητικά φλαβονοειδή ταξινομούνται σε έξι ομάδες, όπως φαίνεται στην εικ.4., και βρίσκονται στη φύση ως γλυκοσυλιωμένα. Η μονάδα του σακχάρου που είναι προσκολλημένη στη δομή των φλαβονοειδών επηρεάζει την απορρόφησή τους από τον εντερικό σωλήνα καθώς και τη βιοδιαθεσιμότητα του συστατικού αυτού. Η γλυκόζη είναι η κύρια μονάδα σακχάρου στα γλυκοσυλιωμένα φλαβονοειδή, χωρίς να αποκλείονται η γαλακτόζη, η ξυλόζη και η αραβινόζη (Yilmaz et al., 2004).

Τα φλαβονοειδή μπορεί να είναι μονομερή, διμερή ή ολιγομερή. Τα μονομερή ποικίλλουν ευρέως σε μέγεθος, για παράδειγμα οι ανθοκυανίνες έχουν οχταπλάσιο μοριακό βάρος συγκριτικά με τις φλαβόνες (Cook and Samman, 1995). Υπάρχουν διάφοροι τύποι ανώτερων δομών των φλαβονοειδών και μια ένα σημαντικό ποσοστό αυτών, που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής, αποτελούν οι πολυμερείς ενώσεις τους (Heim et al., 2002). Οι πολυμερείς ενώσεις φλαβονοειδών, ονομάζονται ταννίνες, και χωρίζονται με βάση τη δομή τους σε δύο ομάδες: τις συμπτυκνωμένες και τις ικανές να υδρολυθούν (Cook and Samman, 1995). Οι συμπτυκνωμένες ταννίνες, ή αλλιώς προανθοκυανιδίνες, αποτελούνται από μονάδες φλαβανολών. Οι προανθοκυανιδίνες που συναντώνται συνήθως στην ανθρώπινη διατροφή αποτελούνται από μονομερή (+)-κατεχίνης και (-)-επικατεχίνης. Οι προανθοκυανιδίνες μπορούν να φτάσουν να έχουν υψηλά μοριακά βάρη, αποτελούμενες από περισσότερες από 17 μονάδες φλαβανολών. Οι ικανές να υδρολυθούν ταννίνες ή γαλλοταννίνες, αποτελούνται από εστέρες γαλλικού οξέος. Οι μονάδες γαλλικού οξέος των ταννινών καθώς και οι μονομερείς κατεχίνες είναι μερικώς υπεύθυνες για το σχηματισμό χηλικών ενώσεων και τη δέσμευση ελεύθερων ριζών, που αποτελούν ιδιότητες των φλαβονοειδών (Heim et al., 2002).

Ο σπόρος του σταφυλιού περιέχει υψηλές ποσότητες προανθοκυανιδών. Οι διμερές προανθοκυανιδίνες είναι οι πιο απλές, και αποτελούνται από 4→8 συνδεδεμένα μονομερή. Στην εικόνα 5 παρουσιάζονται τα πιο συχνά διμερή προανθοκυανιδών, τα B₁, B₂, B₃, B₄, καθώς και τα λιγότερο συνήθη με 4→6 συνδεδεμένα ισομερή B₅, B₆, B₇, B₈ (Yilmaz et al., 2004).

1.3.2. Χημική δομή των φαινολικών οξέων.

Τα φαινολικά οξέα είναι φαινολικά συστατικά της οικογένειας των μη-φλαβονοειδών των φυτικών φαινολών. Υπάρχουν δύο κύριες ομάδες φαινολικών οξέων: τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (hydroxybenzoic acids - HBA) και τα υδροξυκινναμικά οξέα (hydroxycinnamic acids - HCA). Η γενική δομή των υδροξυβενζοϊκών οξέων είναι ο C6-C1 βενζοϊκός δακτύλιος, ενώ διαφέρουν στο βαθμό υδροξυλίωσης και μεθοξυλίωσης του αρωματικού δακτυλίου. Τα υδροξυκινναμικά οξέα (C6-C3) προέρχονται από το κινναμικό οξύ. Και οι δύο προαναφερόμενες ομάδες φαινολικών οξέων περιέχονται στα σταφύλια ως παράγωγα με τη μορφή εστέρων είτε με το ταρταρικό οξύ, είτε με ανθοκυανιδίνες στα κόκκινα σταφύλια (Irena Budic-Leto and Tomislav Lovric, 2002).

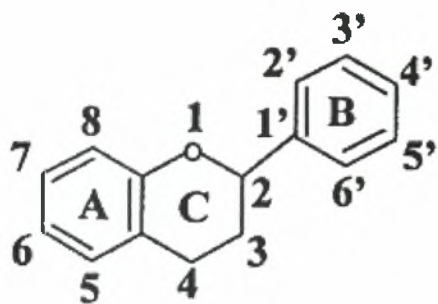
Τα παράγωγα των υδροξυκινναμικών οξέων είναι συνήθως εστεροποιημένα με σάκχαρα, οργανικά οξέα και ποικίλες αλκοόλες. Κρασιά που έχουν ωριμάσει σε δρύινα βαρέλια περιέχουν υψηλότερα επίπεδα παραγώγων των υδροξυβενζοϊκών οξέων, με κυριότερο το ελλαγικό οξύ, το οποίο προέρχεται από την αποικοδόμηση των υδατόδιαλυτών ταννινών (οι ταννίνες μη-φλαβονοειδών είναι πολυμερή του ελλαγικού οξέος, ή του γαλλικού και του ελλαγικού οξέος, μαζί με γλυκόζη. Σε όξινες συνθήκες, οι υδατοδιαλυτές ταννίνες διαχωρίζονται με ευκολία στα συστατικά τους. Το χαμηλό pH του κρασιού είναι υπεύθυνο για την εξασθένιση του δεσμού μεταξύ των ατόμων του υδρογόνου και του οξυγόνου των συνδεδεμένων φαινολών. Εν αντιθέση, οι ταννίνες που προκύπτουν από τη συμπύκνωση φλαβονοειδών, είναι σχετικά σταθερές σε όξινες συνθήκες και συγκρατώνται από ισχυρούς ομοιοπολικούς δεσμούς (George J. Soleas et al., 1997).

1.3.3. Χημική δομή των στιλβενίων.

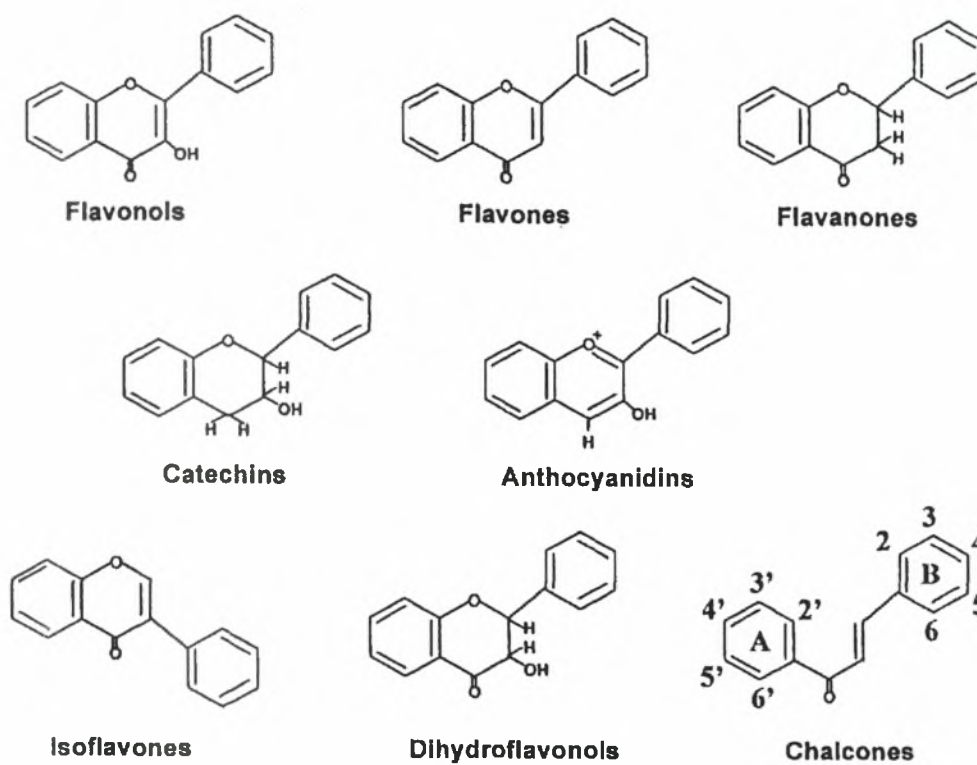
Μια άλλη κλάση των φυτικών φαινολών είναι τα στιλβένια, τα οποία αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των φαινολικών αντιμυκητιακών φυτοαλεξινών (συστατικά που συνήθως συντίθενται μόνο ως απόκριση σε μόλυνση ή σε τραυματισμό). Ο βασικός δομικός σκελετός τους περιλαμβάνει δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται με μια γέφυρα μεθυλενίου. Τα στιλβένια αποτελούνται από μια σειρά από συστατικά που ποικίλουν στον αριθμό και στη θέση των υδροξυλικών ομάδων, στο βαθμό κατά τον οποίο αυτές οι ομάδες αντικαθιστώνται από σάκχαρα, μεθύλ-, μεθοξύλ-, και άλλα κατάλοιπα, στη στερεοχημική διαμόρφωση των χημικά ταυτώσεων μορίων και στην ικανότητά τους να παίρνουν μέρος σε αντιδράσεις για το σχηματισμό πολυμερών. Το πιο ευρέως μελετημένο στιλβένιο είναι η *trans*- ρεσβερατρόλη (George J. Soleas et al., 1997).

Πίνακας 1.1. Οι κυριότερες κλάσεις των φυτικών φαινολικών συστατικών (Ines Urquiaga and Federico Leighton , 2000).

Number of carbon atoms	Basic skeleton	Class	Examples
6	C6	Simple phenols Benzoquinones	Catechol, hydroquinone 2,6-Dimethoxybenzoquinone
7	C6-C1	Phenolic acids	Gallic, salicylic
8	C6-C2	Acetophenones Tyrosine Phenylacetic acids	3-Acetyl-6-methoxybenzaldehyde Tyrosol p-Hydroxyphenylacetic
9	C6-C3	Hydroxycinnamic Phenylpropenes Coumarins Isocoumarins Chromones	acids Caffeic, ferulic Myristicin, eugenol Umbelliferone, aesculetin Bergenon Eugenin
10	C6-C4	Naphthoquinones	Juglone, plumbagin
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiferin
14	C6-C2-C6	Stilbenes Anthraquinones	Resveratrol Emodin
15	C6-C3-C6	Flavonoids Isoflavonoids	Quercetin, cyanidin Genistein
18	(C6-C3)2	Lignans Neolignans	Pinoresinol Eusiderin
30	(C6-C3-C6)2	Biflavonoids	Amentoflavone
n	(C6-C3)n (C6)n (C6-C3-C6)n	Lignins Catechol Flavolans (Condensed Tannins)	melanins

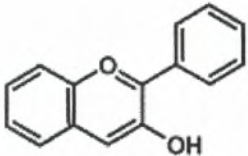
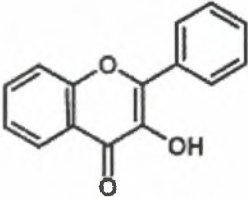
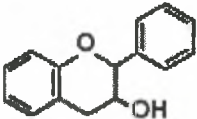
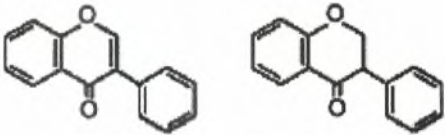
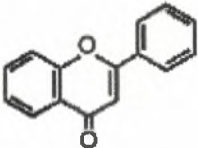
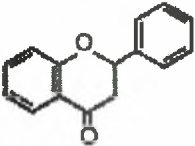


Εικόνα 1.1. Η γενική δομή των φλαβονοειδών (Cook and Samman, 1995).

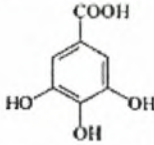
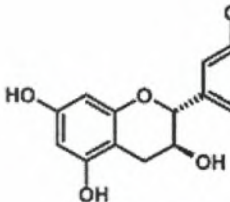
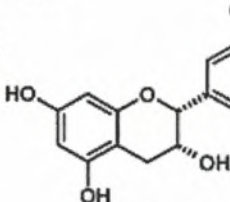
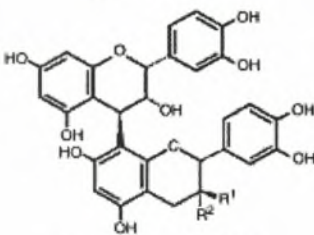
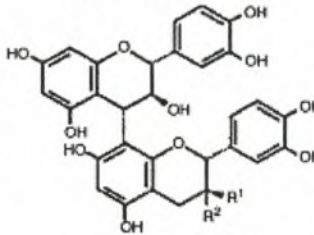
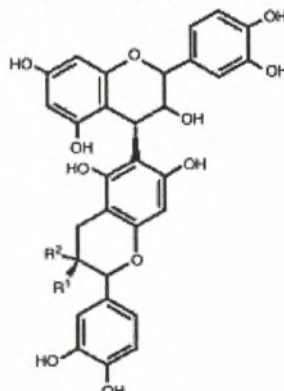
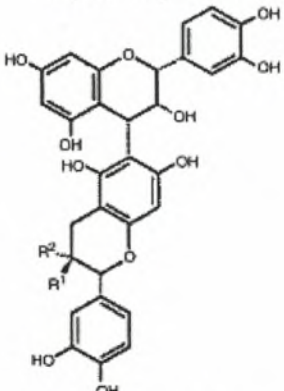


Εικόνα 1.2. Η δομές των κυριότερων τάξεων των φλαβονοειδών (Cook and Samman, 1995).

Πίνακας 1.2. Μοριακή δομή και πηγές των κύριων διαιτητικών φλαβονοειδών (Yilmaz et al., 2004).

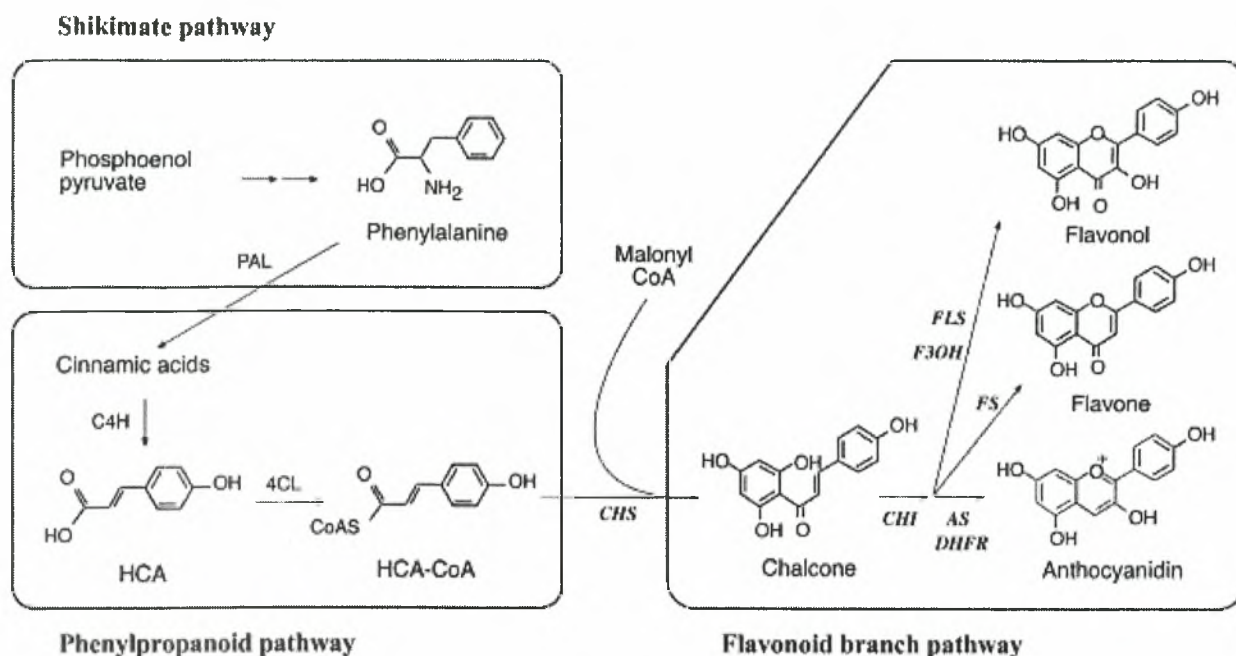
 <p>Anthocyanidins</p>	<p>Έγχρωμα φλαβονοειδή υπεύθυνα για το κόκκινο, μπλε και μοβ χρωματισμό των φρούτων και των λαχανικών, όπως των βατόμουρων, των σταφυλιών, των κερασιών καθώς και των κρασιών, με αντιπροσωπευτικές ενώσεις τη κυανιδίνη και τη μαλβιδίνη.</p>
 <p>Flavonols</p>	<p>Τα κρεμμύδια, τα βατόμουρα, τα κεράσια, το μπρόκολο, τα μήλα, το γκρέιπ-φρουτ, το τσάι και το κόκκινο κρασί είναι βασικές πηγές φλαβονολών, όπως της κερκετίνης.</p>
 <p>Flavanols</p>	<p>Οι φλαβανόλες καλούνται επίσης και προανθοκυανιδίνες, ή φλαβαν-3-όλες, ή κατέχινες. Τα μαύρα σταφύλια, το κόκκινο κρασί και το τσάι είναι εξαιρετες πηγές φλαβανολών, όπως της κατεχίνης και της επικατεχίνης.</p>
 <p>Isoflavonoids</p>	<p>Τα ισοφλαβονοειδή διαχωρίζονται σε: ισοφλαβόνες π.χ. γενιστεΐνη και κουμεστάνες π.χ. κουμεστρόλη.</p>
 <p>Flavones</p>	<p>Τα κρεμμύδια, η φλούδα των μήλων, τα βατόμουρα, το τσάι, το λεμόνι, το λάδι, το σέλινο και το κόκκινο πιπέρι αποτελούν κύριες πηγές των φλαβονών, όπως της ρουτίνης και της χρυσίνης.</p>
 <p>Flavonones</p>	<p>Τα εσπεριδοειδή και ειδικά ο χυμός πορτοκαλιού είναι πλούσια σε φλαβανόνες, όπως η εσπεριδίνη και η ναρινγκίνη.</p>

Πίνακας 1.3. Δομές φαινολικών οξέων, μονομερών και διμερών προανθοκυανιδών που βρίσκονται στο σπόρο και στη φλούδα του σταφυλιού (Yilmaz et al., 2004).

Constituent	Chemical Structure
Phenolic acid	 <p>Gallic acid</p>
Monomers	<div>  <p>(+)-Catechin</p> </div> <div>  <p>(-)-Epicatechin</p> </div>
Procyanidin dimers	<div>  <p>B₁ R¹=OH, R²=H B₂ R¹=H, R²=OH</p> </div> <div>  <p>B₃ R¹=OH, R²=H B₄ R¹=H, R²=OH</p> </div> <div>  <p>B₅ R¹=H, R²=OH B₇ R¹=OH, R²=H</p> </div> <div>  <p>B₆ R¹=OH, R²=H B₈ R¹=H, R²=OH</p> </div>

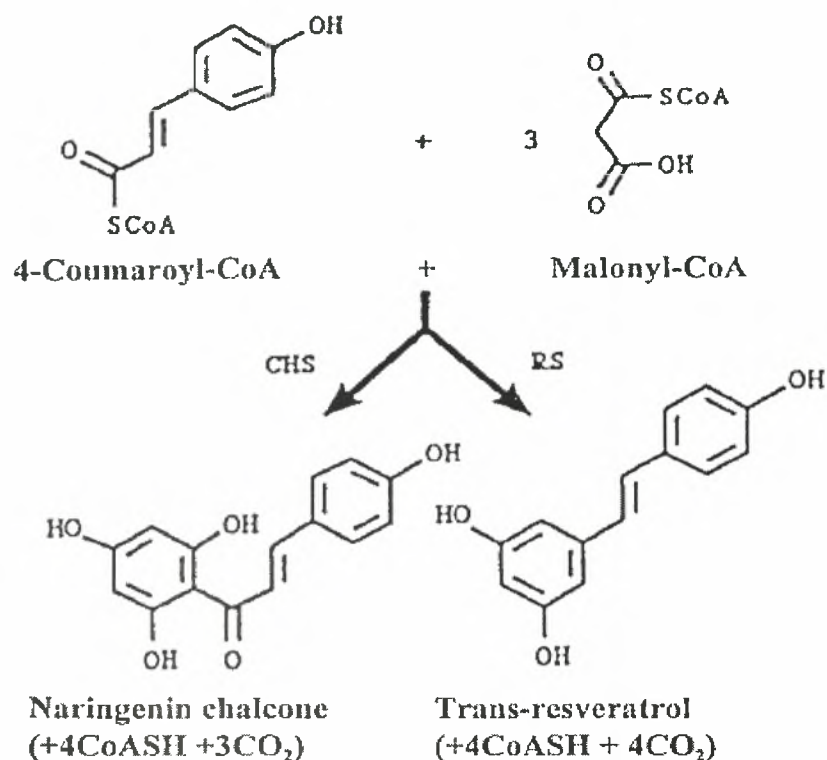
1.4. Βιοσύνθεση των φυτικών πολυφαινολών.

Τα υδροξυκιναμικά οξέα (HCAs) και τα φλαβονοειδή έχουν τον ίδιο βασικό ανθρακικό σκελετό, C6-C3 και C6-C3-C6 αντίστοιχα. Και τα δύο παράγονται από φαινυλαλίνη, μέσω του μονοπατιού, που αποτελεί γενικό μονοπάτι για τα φαινυλπροπανοειδή και ειδικό για τα φλαβονοειδή (Sakihama et al., 2002). Η εικόνα 1 συνοψίζει τις βιοσυνθετικές σχέσεις και βασικές δομές των HCAs και των φλαβονοειδών (Sakihama et al., 2002).



Εικ. 1.3 Διάγραμμα του μονοπατιού βιοσύνθεσης των φυτοφαινολών. Τα υδροξυκιναμικά οξέα (HCAs) και τα φλαβονοειδή προέρχονται από το κινναμικό οξύ, το οποίο σχηματίζεται από την λυάση της φαινυλαλανινικής αμμωνίας (PAL). Το κινναμικό οξύ μετατρέπεται σε HCA μέσω μιας υδροξυλάσης (cinnamate-4-hydroxylase, C4H) και μιας ο-μεθυλτρανσφεράσης. Το ένζυμο 4-κουμαράση:CoA-λιγάση (4CL) καταλύει το σχηματισμό του υδροξυλκινναμοϋλ-CoA (HCA-CoA), και αυτά τα ενεργοποιημένα ενδιάμεσα χρησιμοποιούνται στη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών και της λιγνίνης. Η σύνθεση των φλαβονοειδών ξεκινάει με τη συμπύκνωση του HCA-CoA με τρία μόρια μαλονυλ-CoA, η οποία καταλύεται από τη συνθάση της χαλκόνης (chalcone synthase-CHS). Στην πορεία η χαλκόνη μετατρέπεται σε άλλες υπο-ομάδες των φλαβονοειδών, συμπεριλαμβανομένων των φλαβονών, φλαβονολών και ανθοκυανιδινών. CHI: chalcone isomerase, F3OH: flavanone 3-hydroxylase, ISF: isoflavone synthase, FS: flavone synthase, FLS: flavonol synthase, DHFR: dihydroflavonol reductase, AS: anthocyanin synthase. (Sakihama et al., 2002)

Η παραγωγή της *trans*-ρεσβερατρόλης στα σταφύλια πραγματοποιείται με τη συμπύκνωση ενός μορίου *p*-coumaroyl CoA με τρία μόρια malonyl CoA, μέσω της δράσης της συνθάσης των στιλβενίων και της συνθάσης της ρεσβερατρόλης (εικ. 1.4.), (George J. Soleas et al., 1997).



Εικόνα 1.4. Βιοσύνθεση της ρεσβερατρόλης: οι αντιδράσεις καταλύονται από τα ένζυμα χαλκόνη (chalcone – CHS) και συνθάση της ρεσβερατρόλης (resveratrol synthase – RS), (George J. Soleas et al., 1997).

1.5. Βιοδιαθεσιμότητα – μεταβολισμός των φυτικών πολυφαινολών.

Μια μεγάλη ποικιλία βιολογικών επιδράσεων έχει αποδοθεί στη δράση των διαιτητικών φλαβονοειδών, αλλά πολλές μελέτες έχουν αγνοήσει την ερώτηση: ποιες είναι οι διαθέσιμες συγκεντρώσεις τους στο κυκλοφορικό σύστημα μετά από την πρόσληψη τους μέσω των τροφών καθώς και ποιες οι πιθανότητες δέσμευσής τους και μεταβολισμού τους (Rechner et al., 2002).

Τα περισσότερα διαιτητικά φλαβονοειδή, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, υπάρχουν στα τρόφιμα ως *O* – γλυκοσυλιωμένα, επομένως είναι αναμενόμενη η υδρόλυση των β-δεσμευμένων σακχάρων από τα παγκρεατικά ένζυμα καθώς και η υπόθεση που έχει διατυπωθεί από καιρό, σύμφωνα με την οποία, οι εντερικοί μικροοργανισμοί είναι υπεύθυνοι για τη βήτα-υδρόλυση των σακχάρων-υποκαταστατών (Heim et al., 2002).

Οι βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινολών εξαρτώνται από τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Η χημική δομή των πολυφαινολών καθορίζει το ποσοστό και την έκταση της εντερικής απορρόφησης, καθώς και τη φύση των μεταβολιτών τους που κυκλοφορούν στο πλάσμα. Τα ποσοστά απορρόφησης είναι χαμηλά για την κερκετίνη και τη ρουτίνη (μια γλυκοσυλιωμένη μορφή της κερκετίνης) και υψηλά για τις κατεχίνες του πράσινου τσάι, τις ισοφλαβόνες της σόγιας, τις φλαβανόνες των εσπεριδοειδών ή τις ανθοκυανιδίνες του κόκκινου κρασιού. Στοιχεία που να αποδεικνύουν την εντερική απορρόφησή τους έχουν ληφθεί με μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος μετά από κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε πολυφαινόλες ή με μέτρηση των συγκεντρώσεών τους στο πλάσμα και κατόπιν στα ούρα μετά από κατάποση είτε καθαρών ενώσεων είτε τροφίμων με γνωστό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή (Tapiero et al., 2002).

Η γλυκοσυλίωση επηρεάζει τις χημικές, φυσικές και βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινολών. Για τα γλυκοσυλιωμένα φλαβονοειδή, η αφαίρεση του σακχάρου από τα ένζυμα (γλυκοσιδάσες) και συνεπώς η αφαίρεση της υδρόφιλης μερίδας συνήθως είναι απαραίτητη για την παθητική διάχυση τους κατά μήκος των μικρολαχνών του παχέος εντέρου. Οι αντιδράσεις γλυκοσυλίωσης μπορούν να συμβούν στα ίδια τα τρόφιμα (ενδογενείς ή προστιθέμενες κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας) ή στα κύτταρα του γαστρεντερικού βλεννογόνου ή να οφείλονται στην μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου. Τα ανθρώπινα κύτταρα εκφράζουν μερικές β-γλυκοσιδάσες, αλλά το πρότυπο έκφρασης παρουσιάζει ιστό-εξειδίκευση και συχνά ρυθμίζεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Στα εκχυλίσματα συκωτιού και στο λεπτό έντερο υπάρχει η κυτοσολική β-γλυκοσιδάση (CBG), που είναι ένα διαλυτό ένζυμο παρατηρούμενο σε πολλούς ιστούς. Πολυφαινόλες με δεσμευμένη γλυκόζη, αραβινόζη ή ξυλόζη είναι πιθανά υποστρώματα για τα ενδογενή ανθρώπινα ένζυμα, ενώ οι αντίστοιχες με ραμνόζη δεν αποτελούν υποστρώματα για τις ανθρώπινες β-γλυκοσιδάσες και επομένως μπορούν να αποικοδομηθούν μόνο από την μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου (Tapiero et al., 2002).

Πολλές μη-γλυκοσυλιωμένες φαινόλες είναι υδροφοβικές και μπορούν με παθητική διάχυση να διαπεράσουν τις βιολογικές μεμβράνες. Η δέσμευση της φαινόλης με ένα σάκχαρο ή με ένα οργανικό οξύ αυξάνει τη διαλυτότητα της στο νερό και περιορίζει σημαντικά τη δυνατότητα της παθητικής της διάχυσης. Κάποιες γλυκοσυλιωμένες φλαβονόλες απορροφώνται πιο γρήγορα από κάποιες άλλες, υποδεικνύοντας έναν εν δυνάμει ρόλο του σακχάρου στην επίδραση του ρυθμού απορρόφησης, μιας και η μονάδα του σακχάρου μπορεί να ποικίλει ως προς τον τύπο και τη θέση δέσμευσης ανάλογα με την τροφική προέλευσή της. Γλυκοσυλιωμένες φλαβονόλες, όπως η γλυκοσυλιωμένες μορφές της κερκετίνης, είναι αρκετά υδροφιλικές για να διαπεράσουν με διάχυση τις βιολογικές μεμβράνες γι'αυτό και έχουν προταθεί εναλλακτικοί μηχανισμοί μεταφοράς τους. Ένας από τους προτεινόμενους είναι ο εξαρτώμενος από νάτριο μεταφορέας της γλυκόζης (SGLT1), η μεταφορά όμως των γλυκοσυλιωμένων φαινολών μέσω αυτού δεν έχει αποσαφηνιστεί.

Το πρώτο μεταβολικό βήμα είναι πιθανώς η από-γλυκοσυλίωση των γλυκοσυλιωμένων φλαβονοειδών, που είναι απαραίτητη για τη διεξαγωγή των περαιτέρω βημάτων. Η από-γλυκοσυλίωση μπορεί να συμβεί είτε εξωτερικά του κυττάρου, στον εντερικό αυλό, είτε στο

εσωτερικό των εντερικών κυττάρων μετά τη μεταφορά. Η κυτοσολική β-γλυκοσιδάση που περιέχεται σε εκχυλίσματα ανθρώπινου παχέος εντέρου και συκωτιού, μπορεί να υδρολύσει ποικίλες γλυκοσυλιωμένες φαινόλες. Μια διαφορετική β-γλυκοσιδάση των μικρολάχνων του παχέος εντέρου είναι το ενζυμικό σύμπλεγμα της λακτάσης - φλοριζίνης - υδρολάσης (LPH), η οποία έχει τη δυνατότητα να υδρολύει τη φλοριζίνη σε φλορετίνη (αγλυκόνη). Εφόσον όμως, η φλοριζίνη έχει στενή συσχέτιση με τα γλυκοσυλιωμένα φλαβονοειδή, είναι πιθανό να είναι υπεύθυνη για την υδρολύση φλαβονολών π.χ. κερκετίνη-3-γλυκοσυλιωμένη, οι οποίες δεν αποτελούν υποστρώματα της κυτοσολικής β-γλυκοσιδάσης (Williamson et al., 1999). Η β-γλυκοσιδάση (CBG) βρίσκεται σε μια ποικιλία ιστών και κυρίως στο συκώτι, ενώ η (LPH) βρίσκεται μόνο στο παχύ έντερο (Tapiero et al., 2002).

Κατόπιν, ακολουθεί ο μεταβολισμός των φαινολών από τα ένζυμα μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών της φάσης I ή φάσης II. Ιδιαίτερα τα ένζυμα του συστήματος του κυτοχρώματος P450 συμμετέχουν σε πιθανές αντιδράσεις υδροξυλίωσης ή από-μεθυλίωσης των φλαβονοειδών. Η απο-μεθυλίωση συμβαίνει μόνο όταν η μεθυλική ομάδα βρίσκεται στην 4' θέση του δακτυλίου B και όχι στην 3'. Ενώ, στην περίπτωση της μεθυλίωσης η 3' είναι η θέση που προτιμάται από την κατεχόλ-Ο-μεθύλτρανσφεράση (Williamson et al., 1999). Η κατεχόλ-Ο-μεθυλτρανσφεράση (COMT) μεθυλιώνει τις πολυφαινόλες και βρίσκεται σε μια μεγάλη ποικιλία ιστών. Η δράση της ως προς το υπόστρωμα είναι ειδική και ανάλογα με την πολυφαινόλη καθορίζεται η υδροξυλομάδα του δακτυλίου που θα μεθυλιωθεί (Tapiero et al., 2002). Επίσης, δεν υπάρχει απόδειξη για τη μεθυλίωση οποιασδήποτε άλλης υδροξυλικής ομάδας των φλαβονοειδών εκτός από την κατεχολική ομάδα του B-δακτυλίου (Williamson et al., 1999). Η σύνδεση με μια γλυκουρονική ομάδα ή μια θειική ομάδα είναι οι πιο πιθανές μεταβολικές πορείες για την κερκετίνη και το καφεϊκό οξύ που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονολών και υδροξυκιναμικών οξέων αντίστοιχα (Williamson et al., 1999). Η UDP-γλυκουρονοσύλ-τρανσφεράση (UDPGT, UGT), η οποία καταλύει τη δέσμευση των πολυφαινολών με γλυκουρονικό οξύ, βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και ανήκει σε μια μεγάλη οικογένεια ανάλογων ενζύμων. Η γλυκουρονοποίηση τροποποιείται ανάλογα με το περιβάλλον, τη διαίτα και τους γενετικούς πολυμορφισμούς, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει για παράδειγμα τις διαφορές που παρατηρούνται στη γλυκουρονοποίηση της κατεχίνης ανάμεσα στα άτομα. Η γλυκουρονοποίηση παρατηρείται κυρίως στο συκώτι και σε μικρότερο βαθμό στο έντερο και στα νεφρά. Τα φάρμακα, το αλκοόλ και το κάπνισμα επάγουν την δράση των UGT-ενζύμων. Οι σουλφοτρανσφεράσες των φαινολών (P-PST, SULT) είναι μια μικρή ομάδα κυτοσολικών ενζύμων που είναι ευρέως διαδεδομένα και των οποίων τα ενδογενή υποστρώματα είναι οι ιοδοθυρονίνες καθώς και οι φαινόλες, οι 4-νιτροφαινόλες και οι υδροξυαρυλαμίνες. Γενικά, οι σουλφοτρανσφεράσες δεν επάγονται από τη διαίτα, τις ξενοβιοτικές ουσίες ή το περιβάλλον, ενώ κάποιες από αυτές αναστέλλονται από τις πολυφαινόλες (Tapiero et al., 2002).

Η σύνδεση μιας τοξικής ουσίας με μια φυσιολογική για το σχηματισμό μιας μη τοξικής ένωσης είναι συνήθως αντίδραση αποτοξίνωσης, η οποία αυξάνει τη διαλυτότητα και τη μοριακή μάζα, γεγονός σημαντικό για την έκκριση της ουσίας στη χολή. Η κύρια πορεία για την έκκριση των συνδεδεμένων φλαβονολών είναι πιθανώς αυτή μέσω της χολής, με αποτέλεσμα την επιστροφή τους στο παχύ έντερο. Τα γλυκουρονίδια δεν έχουν την δυνατότητα της παθητικής διάχυσης κατά μήκος του εντέρου λόγω του αρνητικού τους φορτίου σε φυσιολογικό pH. Επομένως, τα γλυκουρονίδια των φλαβονολών φτάνουν στο κόλον, όπου η εντερική μικροχλωρίδα απελευθερώνει το από-γλυκοσυλιωμένο μόριο, οδηγώντας το στην επαναπορρόφηση και στην εντεροηπατική κυκλοφορία.

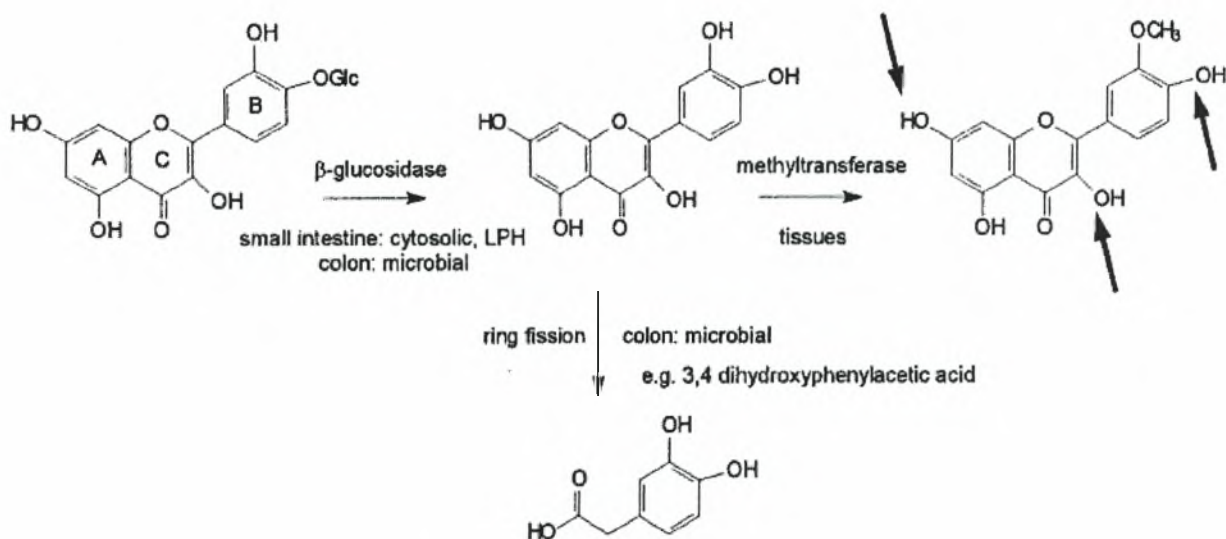
Η υδρολύση των υδροξυλιωμένων ή εστεροποιημένων φαινολών συμβαίνει στο κόλον με τη δράση των μικροβιακών β-γλυκοσιδασών, β-ραμνοσιδασών και εστερασών. Η απελευθέρωση της αγλυκόνης συνήθως συνοδεύεται με αποικοδόμηση των φλαβονολών μέσω πυρηνικής διάσπασης του δακτυλίου, και επομένως οι περισσότερες μεταβολίζονται περαιτέρω σε πιο απλά φαινολικά οξέα (αν και κάποιες φλαβονόλες μπορούν να διαπεράσουν με παθητική διάχυση το

τοίχωμα του παχέος εντέρου). Αυτά τα προϊόντα μπορούν να απορροφηθούν και έχουν ενδυνάμει βιολογική δράση (Williamson et al., 1999).

Η εικόνα 1.5. συνοψίζει το μεταβολικό μονοπάτι της κερκετίνης. Το πρώτο βήμα του μεταβολισμού της είναι η υδρόλυση του δεσμευμένου σακχάρου, που είναι σύνηθες στις περισσότερες φαινόλες. Η από-γλυκοσυλίωση μπορεί να συμβεί στο παχύ έντερο με τη δράση της LPH, ή αφού μεταφερθεί η κερκετίνη στο εσωτερικό του εντεροκυττάρου με τη δράση της κυτοσολικής β-γλυκοσιδάσης. Τα φαινολικά γλυκοσίδια που φτάνουν στον κόλον θα υδρολυθούν από την εντερική μικροχλωρίδα, αλλά μπορούν επίσης να υποστούν και περαιτέρω μεταβολισμό ή αποικοδόμηση. Μόλις απορροφηθούν, οι διαιτητικές φαινόλες μπορούν να μεθυλιωθούν σε ποικίλο βαθμό και στη συνέχεια να δεσμευτούν με σουλφιδικά ή γλυκουρονικά οξέα. Αυτά τα μεταβολικά παράγωγα των φαινολών, είναι υπεύθυνα για την οποιαδήποτε βιολογική δράση (Williamson et al., 1999).

Pathway of quercetin metabolism

Heavy arrows indicate position of sulphate and/or glucuronide conjugation.



Εικόνα 1.5. Το μεταβολικό μονοπάτι της κερκετίνης (Williamson et al., 1999).

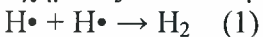
1.6. Βιολογική δράση των φυτικών πολυφαινολών.

Οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών επιδράσεων, που οφείλονται κυρίως στις αντιοξειδωτικές ιδιότητές τους. Προστατεύουν την οξείδωση LDL *in vivo* παίζοντας ρόλο στην πρόληψη της αρτηριοσκλήρυνσης και προστατεύουν επίσης το DNA από την οξειδωτική βλάβη δρώντας χημειοπροστατευτικά στην ανάπτυξη μερικών καρκίνων. Επιπλέον, τα φλαβονοειδή έχουν αντιθρομβωτικά και αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα. Διάφοροι τύποι πολυφαινολών (φαινολικά οξέα, υδατοδιαλυτές ταννίνες, και φλαβονοειδή) παρουσιάζουν αντικαρκινιγόνες και αντιμεταλλαξιγόνες επιδράσεις. Οι πολυφαινόλες μπορούν να παρεμβαίνουν σε αρκετά από τα στάδια που οδηγούν στην ανάπτυξη των κακοήθων όγκων, αδρανοποιώντας τις καρκινογόνες ουσίες, εμποδίζοντας την έκφραση μεταλλαγμένων γονιδίων και τη δραστηριότητα των ενζύμων που περιλαμβάνονται στην ενεργοποίηση των προ-καρκινογόνων και ενεργοποιώντας τα ενζυματικά συστήματα που περιλαμβάνονται στην αποτοξίνωση των ξενοβιοτικών. Εντούτοις, μερικές πολυφαινόλες έχουν επιδείξει μεταλλαξιγόνο δράση, και αυτή η τελευταία δράση τους, δίνει ένα επιπλέον έναυσμα για περαιτέρω και πιο εκτεταμένη μελέτη τους. (Ines Urquiaga and Federico Leighton, 2000)

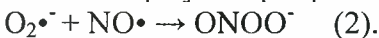
1.6.1. Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες.

Μία ελεύθερη ρίζα είναι οποιοδήποτε είδος-μόριο ικανό να υπάρχει ανεξάρτητα, που περιέχει ένα ή περισσότερα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια (μη συζευγμένο ηλεκτρόνιο είναι αυτό που βρίσκεται μόνο του σε ένα τροχιακό). Η απλούστερη ελεύθερη ρίζα είναι άτομο του στοιχείου υδρογόνου, με ένα πρωτόνιο και ένα μοναδικό ηλεκτρόνιο (Barry Halliwell et al.,2001). Παραδείγματα ριζών οξυγόνου (όπου το μη συζευγμένο ηλεκτρόνιο είναι τοποθετημένο στο οξυγόνο) είναι η ρίζα του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) και η ρίζα του υδροξυλίου (OH^{\bullet}). Άλλα παραδείγματα αποτελούν οιθειϊκό-κεντρικές ρίζες (RS^{\bullet}), οι καρβονύλ-κεντρικές ρίζες (CCI_3^{\bullet}) και του οξειδίου του αζώτου (NO^{\bullet}), το οποίο είναι μια ελεύθερη ρίζα στην οποία το μη συζευγμένο ηλεκτρόνιο μετακινείται μεταξύ δύο διαφορετικών ατόμων.

Οι ρίζες μπορούν να αντιδράσουν μεταξύ τους, για παράδειγμα, τα άτομα υδρογόνου σχηματίζουν διατομικό υδρογόνο (1)

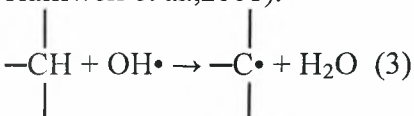


Και το υπεροξείδιο μπορεί να αντιδράσει με οξείδιο του αζώτου (2)



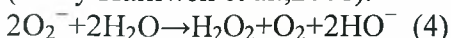
Σε όλες τις περιπτώσεις σχηματίζονται μόρια που δεν είναι ρίζες. Αυτά είναι συνήθως λιγότερο ενεργά από τις ρίζες από τις οποίες προέκυψαν (π.χ. το H_2 είναι λιγότερο χημικά ενεργό από το H^{\bullet}), χωρίς να σημαίνει ότι αυτό ισχύει για όλες τις περιπτώσεις. Παραδείγματος χάριν, το $ONOO^{\bullet-}$ είναι περισσότερο βλαβερό για τους ανθρώπινους ιστούς από το $O_2^{\bullet-}$ ή το NO^{\bullet} .

Τα περισσότερα βιολογικά μόρια δεν είναι ρίζες. Όταν μια ελεύθερη ρίζα αντιδρά με ένα μόριο που δεν είναι ρίζα, παράγεται μια νέα ρίζα. Για παράδειγμα, OH^{\bullet} αντιδρά με υδρογονάνθρακες (συμπεριλαμβανομένων των πλευρικών αλυσίδων των λιπαρών οξέων των μεμβρανικών λιπιδίων) και παράγει μια ανθρακική ρίζα και ένα μόριο νερού (3), (Barry Halliwell et al.,2001).



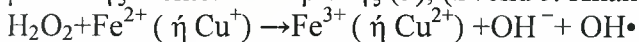
Ο όρος ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS-reactive oxygen species), περιλαμβάνει όχι μόνο ρίζες με κέντρο το οξυγόνο όπως $O_2^{\bullet-}$ και OH^{\bullet} , αλλά και κάποια μη ριζικά παράγωγα του οξυγόνου, όπως υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και υποχλωρικό οξύ ($HOCl$). Ένας άλλος παρόμοιος όρος είναι ενεργές ρίζες του αζώτου (RNS-reactive nitrogen species) Παραδείγματα ενώσεων που ανήκουν στις RNS είναι το NO^{\bullet} καθώς και το μη ριζικό παράγωγο του αζώτου, το νιτρικό οξύ HNO_2 (Barry Halliwell et al.,2001).

Στα πλαίσια του οξειδωτικού στρες οι ρίζες είναι μικρά μόρια/ίόντα που είναι ενεργά με μικρές ενέργειες ενεργοποίησης και σύντομη διάρκεια ζωής. Το μικρό μέγεθος καθιστά πιθανό για πολλές από αυτές να διαπεράσουν τις μεμβράνες των κυττάρων. Το μεγαλύτερο μέρος των ενεργών ριζών του οξυγόνου δημιουργείται ως υποπροϊόν του αεροβικού μεταβολισμού στα μιτοχόνδρια. Το ανιόν του σουπεροξειδίου $O_2^{\bullet -}$, παράγεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων ως ενδιάμεσο προϊόν των αντιδράσεων της αναπνευστικής αλυσίδας (Svend J. Knak Jensen, 2003). Το μεγαλύτερο μέρος του $O_2^{\bullet -}$, που παράγεται *in vivo*, πιθανώς ακολουθεί την αντίδραση (4), από την οποία παράγεται το υπεροξειδίο του υδρογόνου, ένα μη ριζικό μόριο (Barry Halliwell et al., 2001).



Εκτός από την αντίδραση (4), κύρια πηγή σχηματισμού του H_2O_2 είναι το οξειδωτικό deamination των βιογενών αμινών που καταλύεται από το ένζυμο της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, την οξειδάση των μονοαμινών.

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου είναι ένα οξειδωτικό, αν και δεν αποτελεί ρίζα. Έχει σχετικά μεγάλη διάρκεια ζωής και μπορεί να διαχέεται σε μακρινές αποστάσεις πριν πάρει μέρος σε αντιδράσεις. Δεν είναι πολύ ενεργό, αλλά μπορεί σε συνδυασμό με σίδηρο ή άλλα μεταβατικά μέταλλα, να παράγει το μεγάλο βαθμού ενεργό OH^{\bullet} (Svend J. Knak Jensen, 2003), μέσω της Fenton αντίδρασης (5), (Svend J. Knak Jensen, 2003).



Τόσο οι ROS όσο και οι RNS παράγονται στα ζώα και στους ανθρώπους υπό φυσιολογικές αλλά και παθολογικές συνθήκες (Yun-Zhong Fang, 2002). Οι ελεύθερες ρίζες κυρίως παράγονται στο ανθρώπινο σώμα. Κάποιες παράγονται από χημικά ατυχήματα, για παράδειγμα λόγω διαρροής ηλεκτρονίων από τη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφορά τους. Ακόμη, η έκθεση των οργανισμών στην ιονίζουσα ακτινοβολία προκαλεί διάσπαση του O-H δεσμού στο νερό, δημιουργώντας OH^{\bullet} και H^{\bullet} . Οι υδροξυλικές ρίζες αντιδρούν με ρυθμό που εξαρτάται από τη διάχυσή τους, με όλα σχεδόν τα μόρια των ζωντανών κυττάρων, όπως και με το DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Ενώ όμως το OH^{\bullet} είναι πιθανώς βλαβερό σε όλες τις περιπτώσεις, άλλες λιγότερο ενεργές ελεύθερες ρίζες μπορεί να είναι χρήσιμες *in vivo* (Barry Halliwell et al., 2001). Για παράδειγμα, οι ρίζες οξυγόνου παίρνουν μέρος σε λειτουργίες όπως η μεταγωγή σήματος, η γονιδιακή μεταγραφή, και η ρύθμιση της δράσης της γουανυλικής κυκλάσης στα κύτταρα (Yun-Zhong Fang, 2002). Οι ρίζες του σουπεροξειδίου $O_2^{\bullet -}$ που παράγονται από τα φαγοκύτταρα τα βοηθούν στην εξόντωση των βακτηριδίων (Barry Halliwell et al., 2001). Επίσης, το NO είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα μόρια μεταγωγής σήματος και συμμετέχει ουσιαστικά σε κάθε λειτουργία των κυττάρων και των οργάνων στο σώμα. Τα φυσιολογικά επίπεδα του NO που παράγονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι απαραίτητα για τη ρύθμιση της χαλάρωσης-διαστολής και του πολλαπλασιασμού των λείων αγγειακών μυϊκών κυττάρων, τη προσκόλληση λευκοκυττάρων, τη συνάθροιση αιμοπεταλίων, την αγγειογένεση, τη θρόμβωση και τον αγγειακό τόνο. Επιπροσθέτως, το NO που παράγεται από του νευρώνες εξυπηρετεί ως νευροδιαβιβαστής, ενώ αυτό που παράγεται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα είναι ένας σημαντικός μεσολαβητής της ανοσολογικής απόκρισης (Yun-Zhong Fang, 2002).

Η κυτταροτοξική επίδραση των ελεύθερων ριζών είναι επιβλαβής για τα κύτταρα των θηλαστικών και μεσολαβεί στην παθογένεση πολλών χρόνιων παθήσεων, αλλά ταυτόχρονα είναι αρμόδια για τον θάνατο των παθογόνων μικροοργανισμών από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και άλλα φαγοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Επομένως, υπάρχουν από βιολογικής πλευράς "δύο πρόσωπα" των ελεύθερων ριζών, δεδομένου ότι χρησιμεύουν ως μόρια μετάδοσης σήματος και ως ρυθμιστικά μόρια σε φυσιολογικά επίπεδα αλλά και ως ιδιαίτερα επιβλαβή και κυτταροτοξικά οξειδωτικά σε παθολογικά επίπεδα (Yun-Zhong Fang, 2002).

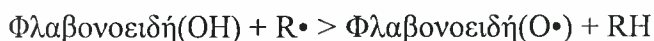
Κάτω από τις φυσιολογικές (υγιείς) συνθήκες οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να ανιχνευθούν στα κύτταρα. Σε ένα υγιές κύτταρο υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ των ενεργών

ριζών και των αντιοξειδωτικών και το οξειδωτικό στρες μπορεί να οριστεί ως η δυσαναλογία μεταξύ των οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών υπέρ των οξειδωτικών. Υψηλότερα από τα κανονικά επίπεδα αντιοξειδωτικών μπορούν επίσης να έχουν αρνητικές επιδράσεις στο κύτταρο. Υπάρχουν αρκετά πειραματικά δεδομένα που αποδεικνύουν ότι το οξειδωτικό στρες συνδέεται με πολλές σοβαρές ασθένειες (Svend J. Knak Jensen, 2003). Πιο συγκεκριμένα οι ROS εμπλέκονται στην αιτιολογία ενός πλήθους εκφυλιστικών ασθενειών συμπεριλαμβανομένης της καρδιαγγειακής πάθησης, του διαβήτη, του καρκίνου, των νευροεκφυλιστικών διαταραχών και της γήρανσης. Επιπλέον, διαδραματίζουν έναν ρόλο σε οξείες συνθήκες όπως το τραύμα, το κτύπημα, η μόλυνση και πιθανώς στη σωματική άσκηση και στο στρες (Tammy M. Bray, 2002). Οι αντιοξειδωτικοί-αμυντικοί μηχανισμοί του σώματος περιλαμβάνουν ένζυμα όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η καταλάση, και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, μη-ενζυμικά συστατικά προερχόμενα από τη διατροφή όπως η γλουταθειόνη, το ασκορβικό οξύ, και η α-τοκοφερόλη (R.J. Nijveldt et al., 2001), πρωτεΐνες που δεσμεύουν μέταλλα όπως η φερριτίνη και η αλβουμίνη, καθώς και μια πληθώρα αντιοξειδωτικών που υπάρχουν σε ποικιλία φυτικών τροφών όπως τα φλαβονοειδή (Mark Percival, 1998).

1.6.2. Αντιοξειδωτική δράση των φυτικών πολυφαινολών.

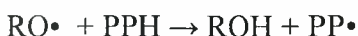
Η χημική αρχή που διέπει την προστασία που προσφέρεται από ένα αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό είναι ότι το αντιοξειδωτικό θα αντιδράσει με το οξειδωτικό, προτού να αντιδράσει το οξειδωτικό με σημαντικά βιομόρια (Svend J. Knak Jensen, 2003). Οι μοριακοί μηχανισμοί που κρύβονται πίσω από τις αντιοξειδωτικές επιδράσεις δεν γίνονται εντελώς κατανοητοί λόγω του ευρέως φάσματος των φαρμακοδυναμικών ιδιοτήτων και της χημικής ετερογένειας των φλαβονοειδών. Είναι γνωστό ότι μπορούν να δεσμευτούν σε βιολογικά πολυμερή όπως ένζυμα, μεταφορείς ορμονών και DNA, να δεσμεύσουν δημιουργώντας χηλικές ενώσεις τα ιόντα μεταβατικών μετάλλων όπως το Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} και Mg^{2+} , να καταλύσουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων και να δεσμεύσουν τις ελεύθερες ρίζες. Η δυνατότητα να σχηματίζουν χηλική ένωση με το Fe^{2+} και να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες κάνει τα φλαβονοειδή πολύ καλά αντιοξειδωτικά, και πολλές από τις φαρμακολογικές δράσεις τους εξηγούνται από τη δράση τους ως αντιοξειδωτικά (Saskia A. B. E. van Acker et al., 1998).

Τα φλαβονοειδή οξειδώνονται από τις ρίζες, με συνέπεια μία σταθερότερη, λιγότερο-ενεργή ρίζα. Με άλλα λόγια, τα φλαβονοειδή σταθεροποιούν τις ενεργές ρίζες οξυγόνου αντιδρώντας με το ενεργό συστατικό της ρίζας. Λόγω της υψηλής ενεργότητας της ομάδας του υδροξυλίου των φλαβονοειδών, οι ρίζες γίνονται ανενεργές, σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

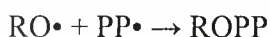


όπου $\text{R}\bullet$ είναι μία ελεύθερη ρίζα και $\text{O}\bullet$ είναι μια ελεύθερη ρίζα οξυγόνου, (Robert J Nijveldt, et al., 2001).

Η οξείδωση των λιπιδίων και των άλλων μορίων από τα φλαβονοειδή πραγματοποιείται μέσω της γρήγορης χορήγησης ενός ατόμου υδρογόνου στις φαινοξυλικές ρίζες, ως εξής:



Η ενδιάμεση φαινοξυλική ρίζα είναι σχετικά σταθερή, και επίσης δρα ως διακόπτης της πορείας διάδοσης των αλυσιδωτών αντιδράσεων των ριζών αλληλεπιδρώντας με άλλες ελεύθερες ρίζες:



(Lynnette R. Ferguson, 2000).

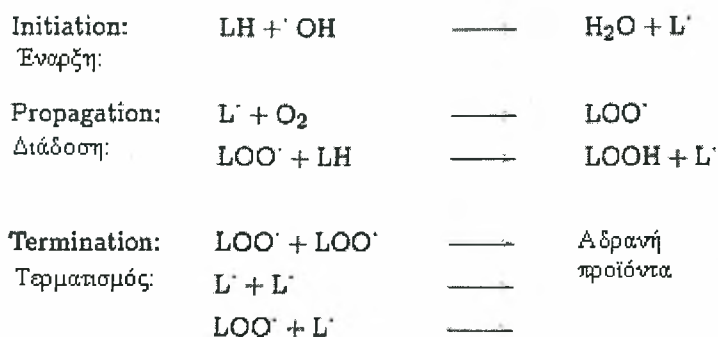
Γενικότερα, η αποτελεσματικότητα των φαινολών ή των πολυφαινολών στη προστασία ενάντια στο οξειδωτικό στρες εξαρτάται από την ικανότητά τους να αντιδρούν με ελεύθερες ρίζες και από την ικανότητα των φαινοξυλικών ριζών να αντιδρούν με σημαντικά βιομόρια (Lynnette R. Ferguson, 2000).

Στην διαδικασία που είναι γνωστή ως αντίδραση Fenton, η παραγωγή ριζών υδροξυλίου συσχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση του χαλκού ή του σιδήρου. Σε παθολογικές καταστάσεις, που έχουν σχέση με το υπερβολικό φορτίο σιδήρου ή με τον μειωμένο διαχωρισμό του σιδήρου από τις πρωτεΐνες μεταφοράς ή αποθήκευσης του, η αντίδραση Fenton είναι ένας σημαντικός παράγοντας σχηματισμού ROS *in vivo*. Τόσο η κερκετίνη όσο και η γλυκοσυλιωμένη μορφή της (η ρουτίνη) είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί δεσμευτές των μεταβατικών μετάλλων, προτείνοντας μικρή διαφορά στη δυνατότητα μεταξύ των μη γλυκοσυλιωμένων και των γλυκοσυλιωμένων να δεσμεύουν μέταλλα. Η προκαλούμενη από την αντίδραση Fenton οξείδωση αναστέλλεται έντονα από φλαβονοειδή με 3',4'-κατεχόλ, 4-όξο, και 5-OH δομικές διευθετήσεις. Συγκρίνοντας την εν δυνάμει δυνατότητα των πολυυδροξυλιωμένων φλαβονοειδών να δεσμεύουν μέταλλα και να εξουδετερώνουν ρίζες, συμπεραίνεται ότι μπορούν να προσφέρουν ιδιαίτερο όφελος ως ανασταλτικοί παράγοντες της αντίδρασης Fenton *in vivo*. Το γεγονός ότι, αυτές οι πολυφαινόλες είναι συχνά αποτελεσματικότεροι ανασταλτικοί παράγοντες της προκαλούμενης από μέταλλα οξείδωσης έναντι της μη προκαλούμενης από μέταλλα οξείδωσης, υποστηρίζει το ρόλο των φλαβονοειδών στη δέσμευση-εξουδετέρωση μετάλλων και μέσω αυτού στην αναστολή της βλάβης από τις ελεύθερες ρίζες (K.E. Heim et al., 2002).

Γενικά, θεωρείται ότι η δυνατότητα των φλαβονοειδών να σχηματίζουν χηλική ένωση με το Fe^{2+} είναι πολύ σημαντική για την αντιοξειδωτική δραστηριότητά τους, επειδή μπορεί να συμβαίνει σε "ειδική περιοχή-δέσμευσης". Αυτό σημαίνει ότι εάν ο Fe^{2+} είναι ακόμα καταλυτικά ενεργός, οι ρίζες θα σχηματίζονται κοντά στο φλαβονοειδές, το οποίο περιβάλλει το Fe^{2+} , και θα μπορούν να δεσμευθούν αμέσως. Σε μια τέτοια περίπτωση, το φλαβονοειδές θα είχε μια διπλή, συνεργιστική δράση, η οποία θα το έκανε ένα εξαιρετικά ισχυρό αντιοξειδωτικό (Saskia A. B. E. van Acker et al., 1998).

Η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για την έρευνα της αποτελεσματικότητας των πολυφαινολών ως αντιοξειδωτικά που διακόπτουν την αλυσίδα αντιδράσεων παραγωγής ριζών. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες οξειδώνονται τόσο μέσω ενζυματικής όσο και μέσω αυτό-οξειδωτικής υπεροξείδωσης καθώς και παίρνοντας μέρος σε αλυσιδωτές αντιδράσεις αλληλεπίδρασης με ελεύθερες ρίζες. Μια υπερ-αφθονία ελεύθερων ριζών μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτες αλυσιδωτές αντιδράσεις καθώς και στη λιπιδιακή υπεροξείδωση, η οποία στη συνέχεια έχει ως αποτέλεσμα παθολογικές καταστάσεις όπως την αθηροσκλήρυνση και τον καρκίνο (N.C. Cook and S. Samman, 1996). Επίσης, συνεχώς αυξάνονται τα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η οξειδωτική τροποποίηση των LDL είναι συμβάλλουσα στις αθηρογενητικές αντιδράσεις, και ως εκ τούτου αυξάνει τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα των στεφανιαίων καρδιακών παθήσεων (Anne S. Meyer et al., 1997).

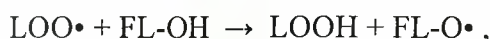
Η λιπιδιακή υπεροξείδωση περιλαμβάνει τρία στάδια: την έναρξη, τη διάδοση και τον τερματισμό. Στο στάδιο της έναρξης της λιπιδιακής υπεροξείδωσης, οι ελεύθερες ρίζες παίρνουν υδρογόνα από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα για να σχηματίσουν τη λιπιδιακή ρίζα (N.C. Cook and S. Samman, 1996), (Mylonas C. and Kouretas D., 1999). Η έναρξη της υπεροξείδωσης των λιπιδίων μπορεί να προκληθεί από $OH\cdot$ και από συμπλέγματα μεταλλικών ιόντων με ελεύθερες ρίζες (Elliott Middleton et al., 2000). Στο επόμενο στάδιο της διάδοσης, η λιπιδιακή ρίζα αλληλεπιδρά με μοριακό οξυγόνο για να σχηματίσει τη λιπιδιακή υπεροξύ ρίζα που διαχωρίζεται για να παράγει περισσότερες ελεύθερες ρίζες, διατηρώντας έτσι την αλυσίδα των αλληλεπιδράσεων. Στο τελευταίο στάδιο του τερματισμού, τα είδη των ελεύθερων ριζών αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή με αντιοξειδωτικά για να σχηματίσουν αδρανή προϊόντα.



Εικόνα 1.6.

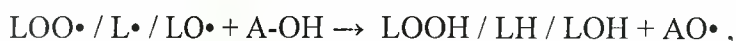
Επαγωγή της λιπιδιακής υπεροξειδωσης.
(Elliott Middleton et al., 2000)

Η λιπιδιακή υπεροξειδωση μπορεί να κατασταλαλεί μέσω ενζυματικής από- ενεργοποίησης των ελεύθερων ριζών και μέσω αντιοξειδωτικών που εμποδίζουν το αρχικό στάδιο και/ή επιταχύνουν το τελικό στάδιο (N.C. Cook and S. Samman, 1996). Η υπεροξειδωση των λιπιδίων μπορεί να αποτραπεί στο στάδιο της έναρξης από τους δεσμευτές ελεύθερων ριζών, ενώ η διάδοση των αλυσιδωτών αντιδράσεων μπορεί να παρεμποδιστεί από τους δεσμευτές υπεροξύλ- ριζών όπως τα φαινολικά αντιοξειδωτικά. Η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών στο στάδιο της διάδοσης μπορεί να αντιπροσωπευθεί από την αντίδραση που παρουσιάζεται κατωτέρω:



όπου το FL-OH αντιπροσωπεύει το φλαβονοειδές.

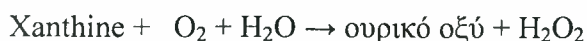
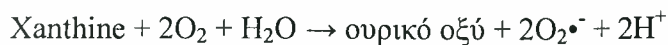
Ο τερματισμός των λιπιδιακών ριζών (L^\cdot), των υπεροξύλ- λιπιδιακών ριζών (LOO^\cdot), και των αλκοξύλ-ριζών (LO^\cdot), από τα φαινολικά αντιοξειδωτικά παρουσιάζεται παρακάτω:



όπου το A-OH αντιπροσωπεύει φαινόλες (π.χ. α-τοκοφερόλη, φλαβονοειδή) και το AO^\cdot τη φαινοξυλική ρίζα (Elliott Middleton et al., 2000).

Η οξειδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για την έρευνα της αποτελεσματικότητας των πολυφαινόλων ως αντιοξειδωτικά που διακόπτουν την αλυσίδα αντιδράσεων παραγωγής ριζών.

Πιθανότατα η κύρια αντιοξειδωτική δραστηριότητα που είναι συνδεδεμένη με τις πολυφαινόλες είναι η δυνατότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών. Εντούτοις, ορισμένες πολυφαινόλες μπορούν να επάγουν ένζυμα της φάσης II όπως την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), η οποία ενισχύει την έκκριση οξειδωτικών ριζών, ή να επάγουν αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως τη μεταλλοθειονίνη (μια μέταλλο-δεσμευτική πρωτεΐνη με αντιοξειδωτική δυνατότητα). Οι πολυφαινόλες μπορούν επίσης να αναστέλλουν το κυτόχρωμα P450s (CYPs) (Lynnette R. Ferguson, 2000), ένζυμα όπως την κυκλοοξυγονάση ή λιποοξυγονάση που αναπτύσσουν οξειδωτικές δραστηριότητες παίρνοντας μέρος στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος, η ρύθμιση του οποίου συνδέεται με πολλούς τύπους καρκίνου ιδιαίτερα με αυτούς του εντέρου (S. M. Prescott and R. L. White, 2000), (Jungil Hong et al., 2001), καθώς και ένζυμα-κλειδιά της μιτοχονδριακής αναπνοής όπως τη NADH-οξειδάση (J. B. Harborne and C. A. Williams, 2000). Επίσης, κάποια φλαβονοειδή αναστέλλουν το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης, το οποίο καταλύει την οξειδωση της ξανθίνης και της υποξανθίνης σε ουρικό οξύ, παράγοντας ταυτόχρονα ρίζες σουπεροξειδίου και υπεροξείδιο του υδρογόνου, σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις:

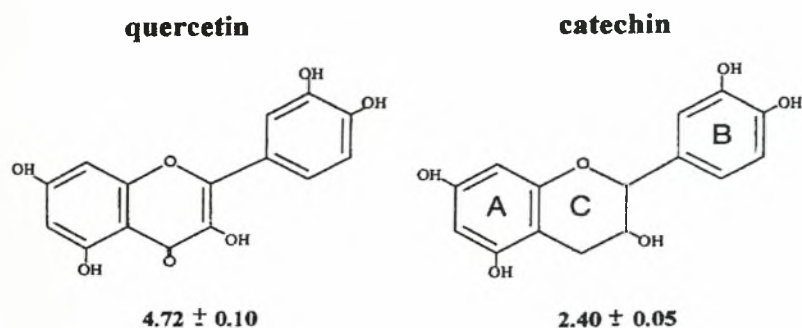


Η οξειδάση της ξανθίνης θεωρείται ότι είναι σημαντική βιολογική πηγή των ριζών υπεροξειδίου και βάση αυτού τα φλαβονοειδή μπορεί να αποτελέσουν υποσχόμενη θεραπεία της ανθρώπινης ισχαιμίας ελαττώνοντας της συγκεντρώσεις του ουρικού οξέως και του υπεροξειδίου στους ιστούς (Paul Cos et al., 1997).

1.6.2.1. Συσχέτιση δομής και αντιοξειδωτικής δράσης των φυτικών πολυφαινόλων.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών και των μεταβολιτών τους *in vitro* εξαρτάται από τη θέση και τον προσανατολισμό των λειτουργικών τους ομάδων σε σχέση με την πυρηνική τους δομή (Heim et al., 2002). Ο Rice-Evans και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν το τεστ για την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Activity – TAA) ή αλλιώς ισοδύναμης με το Trolox αντιοξειδωτικής ικανότητας (Trolox Equivalent Antioxidant Activity – TEAC), το οποίο μετράει τη συγκέντρωση του Trolox διαλύματος που είναι ισοδύναμη με το αντιοξειδωτικό δυναμικό δεδομένης συγκέντρωσης του εξεταζόμενου συστατικού. Το TEAC αντικατροπτίζει την δυνατότητα των αντιοξειδωτικών να προσφέρουν υδρογόνα για τη δέσμευση των (ABTS⁺) κατιόντων [τα (ABTS⁺) προκύπτουν από την αντίδραση των ABTS - 2,2'-azinobis-(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) με ενεργοποιημένη μεθ-μυογλοβίνη], σε σύγκριση με την αντιοξειδωτική ικανότητα του Trolox, που είναι το υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης Ε. Τα (ABTS⁺) απορροφούν στην περιοχή γύρω από τα μέγιστα 734, 645 και 815nm. Τα αντιοξειδωτικά καταστέλλουν την απορρόφηση στα 734nm σε έκταση και χρονική περίοδο που εξαρτάται από την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Ως TEAC ορίζεται η συγκέντρωση του Trolox διαλύματος με ισοδύναμο αντιοξειδωτικό δυναμικό με αυτό που έχει το 1mM συγκέντρωσης του υπό εξέταση συστατικού (Rice-Evans et al., 1995).

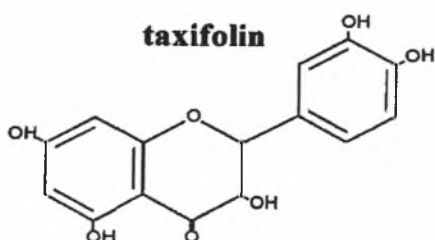
Στην εικόνα 1.7 απεικονίζονται δύο φλαβονοειδή μαζί με τις ισοδύναμες με το Trolox αντιοξειδωτικές ικανότητες τους (TEAC): η κερκετίνη, μία φλαβονόλη με πέντε υδροξύλια και η κατεχίνη, μία φλαβονόλη με επίσης πέντε υδροξύλια και με ταυτόσημη, με την κερκετίνη, διευθέτηση των πέντε υδροξυλικών ομάδων. Η κερκετίνη διαφέρει από την κατεχίνη στο γεγονός ότι περιέχει τον 2,3-διπλό δεσμό στο C δακτύλιο καθώς και στη 4-όξο θέση του δακτυλίου. Αυτή η δομή της κερκετίνης συντελεί σε μια ενίσχυση της τιμής TEAC στα $4,7 \pm 0,1 \text{ mM}$, συγκρινόμενη με την σχεδόν μισή τιμή της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κορεσμένου ετεροκυκλικού δακτυλίου της κατεχίνης ($2,4 \pm 0,05 \text{ mM}$). Από την παραπάνω σύγκριση προκύπτει η σημασία του μη κορεσμού του C δακτυλίου σχετικά με την θετική επίδραση που ασκεί στην αντιοξειδωτική δράση των μορίων (Rice-Evans et al., 1995).



Εικόνα 1.7. Τιμές TEAC της κερκετίνης και της κατεχίνης. (Rice-Evans et al., 1995).

Σύμφωνα με τα δεδομένα του πίνακα, για τη μέγιστη αποτελεσματικότητα όσον αφορά στη δέσμευση ριζών, είναι απαραίτητη η δέσμευση της 3-OH ομάδας στον 2,3-διπλό δεσμό, παρακείμενα του 4-καρβονυλίου του C δακτυλίου. Διατηρώντας την τύπου-κατεχόλης δομή (δέσμευση υδροξυλίου στις θέσεις 3' και 4') στο B δακτύλιο και αφαιρώντας τον 2,3 διπλό δεσμό του C δακτυλίου, περιορίζεται ο τρόπος μετακίνησης των ηλεκτρονίων από την αρυλοξυλική ρίζα του B δακτυλίου στον Α δακτύλιο, κάτι που παρατηρείται στην ταξιφολίνη (διυδροόκερκετίνη), δίνοντας της μια τιμή TEAC $1,9 \pm 0,03\text{mM}$. Ανάλογη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας παρατηρείται, παρουσία των 3' και 4' OH-ομάδων του B δακτυλίου και του 2,3-διπλού δεσμού και απουσίας της 3 OH ομάδας του C δακτυλίου.

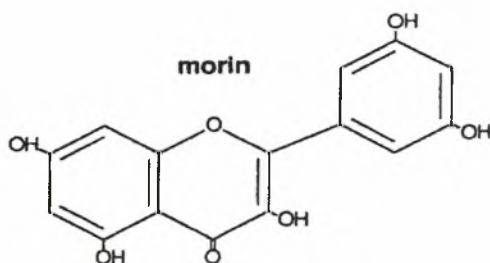
Ο 2,3 διπλός δεσμός, συνεισφέρει ελάχιστα στην ικανότητα προσφοράς ηλεκτρονίων χωρίς τη διφαινολική δομή του B δακτυλίου, μιας και ο μονοφαινολικός δακτύλιος δεν τόσο αποτελεσματικός δότης υδρογόνων. Επομένως, μία μόνο υδροξυλική ομάδα στο B δακτύλιο ακόμη και σε συνδυασμό με τον 2,3-διπλό δεσμό και την 3-OH ομάδα του C δακτυλίου, επίσης συνεισφέρει ελάχιστα στην ενίσχυση της αντιοξειδωτικής δράσης.



1.9 ± 0.03

Εικόνα 1.8. Τιμή TEAC της ταξιφολίνης (διυδροόκερκετίνης), (Rice-Evans et al., 1995).

Η σημασία της επίδρασης της ορθο-διφαινολικής τοποθέτησης των παρακείμενων 3' και 4' OH-ομάδων του B δακτυλίου στην αντιοξειδωτική δράση της κερκετίνης ($4,7 \pm 0,1\text{mM}$), αποκαλύφθηκε από τη μελέτη της μορίνης, στην οποία η 3' και 4' OH-ομάδες είναι τοποθετημένες μετά-, οδηγώντας την τιμή TEAC της ουσίας στα $2,55 \pm 0,02\text{mM}$. Σε περιπτώσεις απουσίας της διυδροξυλικής δομής του B-δακτυλίου, οι 5 και 7 OH-ομάδες του Α-δακτυλίου συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική δράση των ουσιών.



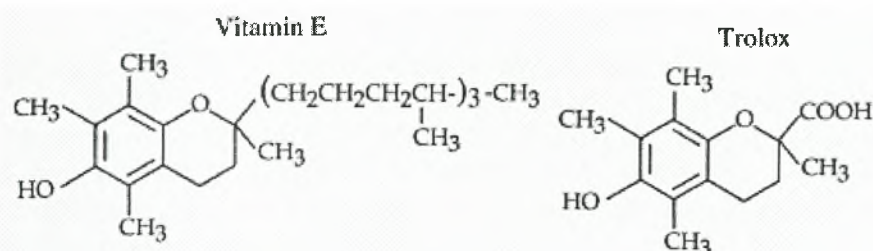
2.55 ± 0.02

Εικόνα 1.9. Τιμή TEAC της μορίνης, (Rice-Evans et al., 1995).

Οι διαφορές στην αντιοξειδωτική ικανότητα μεταξύ πολύ-υδροξυλιωμένων και πολύ-μεθυλιωμένων φλαβονοειδών πιθανώς να οφείλονται κυρίως σε διαφορές που παρατηρούνται στην υδροφοβικότητα και στο μοριακή συμμετρία (Heim et al., 2002). Η γλυκοσυλίωση των φλαβονοειδών μειώνει την αντιοξειδωτική τους δράση συγκρινόμενη με αυτή των μη-γλυκοσυλιωμένων, για παράδειγμα η γλυκοσυλίωση της 7 OH-ομάδας του Α- δακτυλίου σε δομή με κορεσμένο το C-δακτύλιο και μία μόνο OH-ομάδα στον Β-δακτύλιο, έχει έντονη κατασταλτική επίδραση στην αντιοξειδωτική ικανότητα (Rice-Evans et al., 1995). Οποιοδήποτε σάκχαρο-υποκαταστάτης, εκτός από την κατάληψη των ελεύθερων OH-ομάδων απαραίτητων για την αφαίρεση των υδρογόνων και τη δέσμευση ριζών, είναι ικανό να (i) μειώνει την ομοιοεπιπεδότητα του Β-δακτυλίου σχετικά με αυτή του υπόλοιπου μορίου, ή/και (ii) να αυξάνει την υδροφιλικότητα, αλλάζοντας την πρόσβαση στις περοξύλ- και αλκοξύλ-ρίζες των λιπιδίων κατά τη διάρκεια της διάδοσης λιπιδιακής υπεροξειδωσης στις μεμβράνες. Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερθέντα στοιχεία, σύμφωνα με τα οποία οι γλυκοσιδικοί δεσμοί διασπώνται συχνά στο επίπεδο των εντέρων, η επιρροή των σακχάρων υποκαταστατών στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες είναι αμφισβητήσιμης σημασίας στους ανθρώπους. Πολλαπλά στοιχεία συγκλίνουν στο ό,τι η αφαίρεση του γλυκοσιδικού υποκαταστάτη από τα εντερικά ένζυμα ή τα βακτηρίδια είναι πιθανό να αυξάνει τη δραστηριότητα των διαιτητικών φλαβονοειδών *in vivo* (Heim et al., 2002). Αν και η αναλογία μεθοξυλικών : υδροξυλικών υποκαταστατών δεν προβλέπει απαραίτητα τη δυνατότητα δέσμευσης ριζών των φλαβονοειδών, ο Β-δακτύλιος είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στη θέση της μεθοξυλικής ομάδας (Heim et al., 2002). Μείωση της τιμής TEAC από $1,5 \pm 0,05 \text{mM}$ (ναρινγκενίνη) σε $1,37 \pm 0,03 \text{mM}$ (χεσπερίτίνη), έχει παρατηρηθεί στην περίπτωση υποκατάστασης της 4'OH-ομάδας σε ορθο-διφαινολικό Β-δακτύλιο, με μεθοξυλική ομάδα (Rice-Evans et al., 1995).

Συνοψίζοντας, τρία είναι τα κριτήρια για αποτελεσματική δέσμευση των ριζών από τις πολυφαινόλες:

1. η ο-διυδροξυλική δομή του Β-δακτυλίου, η οποία προσφέρει υψηλή σταθερότητα στο ριζικό σχηματισμό και συμμετέχει στην μετακίνηση ηλεκτρονίων,
2. ο 2,3-διπλός δεσμός σε συνδυασμό με την 4-όξο θέση του C-δακτυλίου, είναι υπεύθυνος για την μετακίνηση των ηλεκτρονίων από το Β-δακτύλιο – η αντιοξειδωτική δυνατότητα του μορίου είναι ανάλογη με τη δομή στο επίπεδο της μετακίνησης των ηλεκτρονίων του αρωματικού πυρήνα,
3. οι 3- και 5-OH ομάδες μαζί με την 4-όξο λειτουργία στους Α και C δακτυλίους, είναι απαραίτητες για τη μέγιστη δυνατότητα δέσμευσης ριζών (Rice-Evans et al., 1995).



Εικ.1.10. Χημική δομή της βιταμίνης E και του υδατοδιαλυτού ανάλογού της-Trolox (K. Ishige et al., 2000).

Πίνακας 1.4. Ιεράρχηση των πολυφαινολών με βάση τις τιμές TEAC για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα (Rice-Evans et al., 1995).

Compound	Free OH-Substituents	Glycosylated Position	TEAC (mM)	n	Family
Epicatechin gallate	3, 5, 7, 3', 4', 3'', 4'', 5''		4.9 ± 0.02	[3]	flavanol
Epigallocatechin gallate	3, 5, 7, 3', 4', 5', 3'', 4'', 5''		4.8 ± 0.06	[3]	flavanol
Quercetin	3, 5, 7, 3', 4'		4.7 ± 0.1	[6]	flavonol
Delphinidin	3, 5, 7, 3', 4', 5'		4.44 ± 0.11	[5]	anthocyanidin
Cyanidin	3, 5, 7, 3', 4'		4.4 ± 0.12	[5]	anthocyanidin
Epigallocatechin	3, 5, 7, 3', 4', 5'		3.8 ± 0.06	[3]	flavanol
Keracyanin	5, 7, 3', 4'	3-rut	3.25 ± 0.1	[3]	anthocyanin
Myricetin	3, 5, 7, 3', 4', 5'		3.1 ± 0.30	[6]	flavonol
Gallic acid	3, 4, 5		3.01 ± 0.05	[7]	hydroxybenzoate
Ideain	5, 7, 3', 4'	3-gal	2.9 ± 0.03	[3]	anthocyanin
Morin	3, 5, 7, 3', 4', 5'		2.55 ± 0.02	[3]	flavonol
Epicatechin	3, 5, 7, 3', 4'		2.5 ± 0.02	[6]	flavanol
Gallic acid methyl ester	3, 4, 5		2.44 ± 0.03	[3]	hydroxybenzoate
Catechin	3, 5, 7, 3', 4'		2.4 ± 0.05	[9]	flavanol
Rutin	5, 7, 3', 4',	3-rut	2.4 ± 0.06	[7]	flavonol
Apigenidin	5, 7, 4'		2.35 ± 0.2	[4]	anthocyanidin
Peonidin	3, 5, 7, 4'	3'-OMe	2.22 ± 0.2	[4]	anthocyanidin
Luteolin	5, 7, 3', 4'		2.1 ± 0.05	[4]	flavone
Malvidin	3, 5, 7, 4'	3',5'-di-OMe	2.06 ± 0.1	[4]	anthocyanidin
Taxifolin	3, 5, 7, 3', 4'		1.9 ± 0.03	[6]	flavanone
Oenin	5, 7, 4'	3',5'-diOme	1.78 ± 0.02	[3]	anthocyanin
Luteolin-4'-glucoside	5, 7, 3'	3-gluc 4'-gluc	1.74 ± 0.09	[4]	flavone
Naringenin	5, 7, 4'		1.53 ± 0.05	[4]	flavanone
Apigenin	5, 7, 4'		1.45 ± 0.08	[6]	flavone
Chrysin	5, 7		1.43 ± 0.07	[6]	flavone
Hesperitin	3, 5, 7, 3'	4'-OMe	1.37 ± 0.08	[3]	flavanone
Kaempferol	3, 5, 7, 4'		1.34 ± 0.08	[6]	flavonol
Pelargonidin	3, 5, 7, 4'		1.30 ± 0.1	[6]	anthocyanidin
Hesperidin	3, 5, 3'	4'-OMe	1.08 ± 0.04	[5]	flavanone
Luteolin-3',7-diglucoside	5, 4'	7-rut 3',7-digluc	0.79 ± 0.04	[4]	flavone
Narirutin	5, 4'	5-rut	0.76 ± 0.05	[3]	flavanone

1.6.3. Προ-οξειδωτική δράση των φυτικών πολυφαινόλων.

Παρά την ισχυρή αντιοξειδωτική δράση τους, οι φυτικές πολυφαινόλες μπορούν να συμμετέχουν και σε προοξειδωτικές αντιδράσεις. Οι μοριακοί μηχανισμοί της προ-οξειδωτικής δράσης των φλαβονοειδών μπορεί να συμπεριλαμβάνουν το σχηματισμό (α) μιας οξειδοαναγωγικής ασταθούς αροξύλ-ρίζας ή/και (β) ενός οξειδοαναγωγικά ασταθούς φλαβονοειδές-Fe συμπλόκου.

Στην πρώτη περίπτωση, η αυτό-οξείδωση της οξειδοαναγωγικά ασταθούς ρίζας (αροξύλ-ρίζα) παραγόμενης από το αντιοξειδωτικό οδηγεί σε παραγωγή ανιόντος του υπεροξειδίου, το οποίο προκαλεί οξειδωτική βλάβη, σύμφωνα με τη γνωστή αντίδραση: $O_2^{\bullet-} \rightarrow H_2O_2 \rightarrow HO^{\bullet}$. Στη δεύτερη περίπτωση, ένα οξειδοαναγωγικά ασταθές σύμπλοκο φλαβονοειδούς με μέταλλο μπορεί να διευκολύνει τυχαία τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (αντίδραση Fenton), προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο βλάβη στα βιομόρια (Enrique Cadenas, Ph, University of Southern California). Επομένως, φλαβονοειδή με κατεχόλ- ή πυρογαλόλ- B δακτυλίους, μπορούν να αυτό-οξειδωθούν παρουσία μεταβατικών μετάλλων και να παράγουν έτσι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS), οι οποίες επιταχύνουν την οξείδωση LDL κατά τη δεύτερη φάση της διάδοσης ή προκαλούν σπασίματα στους κλώνους του DNA (Tom Chan et al., 1998). Αυτοί οι μηχανισμοί, που αποσαφηνίζονται στην εικόνα 1.11.1, μπορεί να είναι η βάση μερικών από τις μεταλλαξιογόνες και κυτταροτοξικές δραστηριότητες των φλαβονοειδών.

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι προοξειδωτικές και μεταλλαξιογόνες ιδιότητες των φλαβονοειδών συνδέονται πρώτιστα με τη δυνατότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών αυτών των ενώσεων. Εντούτοις, αυτό που καθορίζει το προοξειδωτικό ή αντιοξειδωτικό χαρακτήρα της αρχικής αντίδρασης στην οποία παίρνουν μέρος, όπως αναφέρεται ανωτέρω, είναι η οξειδοαναγωγική σταθερότητα των παραγόμενων από τα φλαβονοειδή ή από το σύμπλοκα φλαβονοειδών-μετάλλων, ριζών (Enrique Cadenas, Ph, University of Southern California).

Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου, που παράγονται από τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις ανακύκλωσης των φλαβονοειδών, μπορούν να βλάψουν το DNA, οδηγώντας σε διάφορες βιολογικές διαδικασίες όπως η μεταλλαξιογένεση, η γήρανση, η καρκινογένεση και η μικροβιακή αδρανοποίηση. Οι βλάβες που προκαλούνται στο DNA μέσω οξειδωτικών μηχανισμών περιλαμβάνουν σπασίματα των κλώνων του DNA και τροποποίηση των βάσεων του. Στο άρθρο του Masataka Yoshino και των συνεργατών του αποδεικνύεται ότι μερικά φλαβονοειδή προκαλούν σπασίματα στους κλώνους του DNA καθώς και το σχηματισμό 8-υδροξύ-29-δεοξυγουανοσίνης (8- OHdG), που είναι το καλύτερα χαρακτηρισμένο DNA adduct (προϊόν που σχηματίζεται από την ομοιοπολική σύνδεση μιας χημικής ένωσης με το DNA), (Masataka Yoshino et al., 1999).

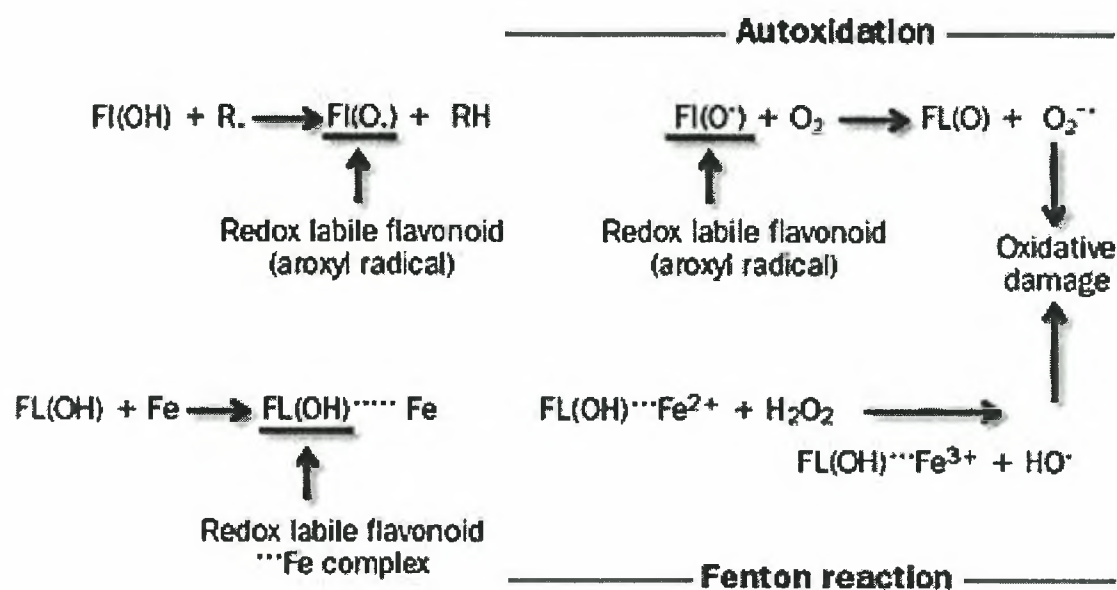
Μηχανισμοί, όπως εκείνοι που παρουσιάζονται στο *εικόνα 1.11.2*, μπορούν να συντελέσουν στη μεταλλαξιογόνο δράση της κερκετίνης υπό *in vitro* συνθήκες (Enrique Cadenas, Ph, University of Southern California). Τα στοιχεία καρκινογένεσης για την κερκετίνη είναι αντικρουόμενα και παρατηρήσεις μεταλλαξιογένεσης που αποδίδονται σε μερικές φλαβονόλες πιθανώς είναι αποτέλεσμα της αυτό-οξείδωσης τους κατά τη διάρκεια των *in vitro* τεστ μεταλλαξιογένεσης. Η προ-οξειδωτική δράση που προκύπτει μέσω του δεύτερου μηχανισμού μπορεί να μην είναι σημαντική *in vivo* (Tom Chan et al., 1998), διότι τα μέταλλα μετάβασης που βρίσκονται *in vivo* και στο πλάσμα σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες και είναι απίθανο να



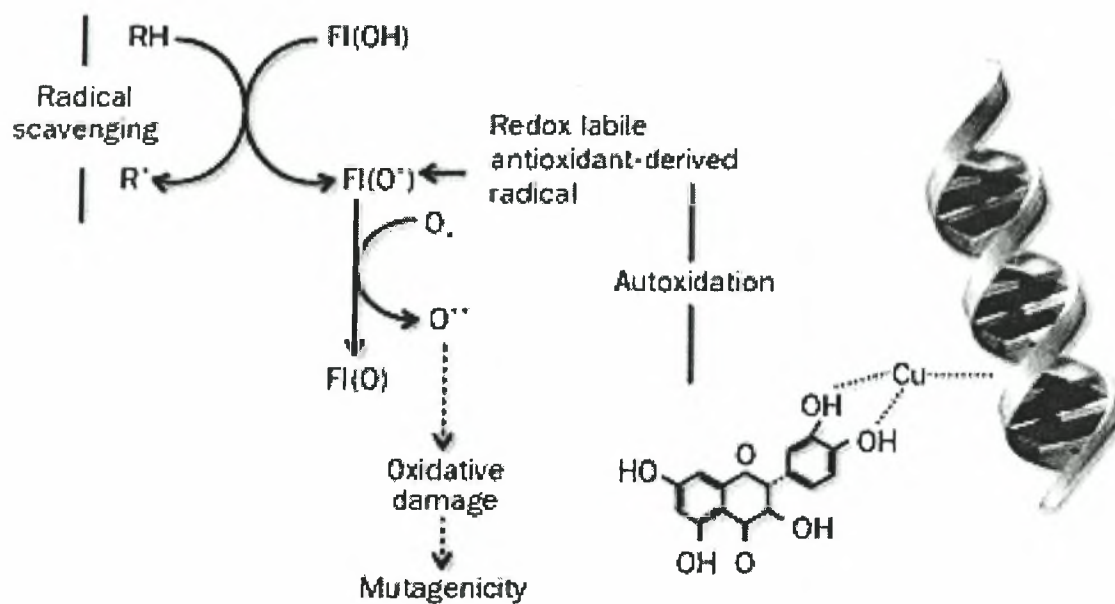
καταλύουν την αυτό-οξειδωση των πολυφαινολών σε σημαντικό βαθμό (Giuseppe Galati et al.,2002).

Επομένως, η αυτό-οξειδωση των αροξύλ-ριζών ή, εναλλακτικά, ο σχηματισμός των τριαδικών συμπλεγμάτων μεταξύ του DNA, των μεταβατικών μετάλλων, και των φλαβονοειδών, είναι πιθανές εξηγήσεις για τη μεταλλαξιγένεση που προκαλείται από τη δράση των φλαβονοειδών. Συνήθως, υψηλές συγκεντρώσεις φλαβονοειδών απαιτούνται για τη μεταλλαξιγόνο δράση τους. Επίσης, μερικά φλαβονοειδή απαιτούν τη μεταβολική ενεργοποίηση προκειμένου να γίνουν μεταλλαξιγόνα (Enrique Cadenas, Ph, University of Southern California).

Ένας εναλλακτικός μηχανισμός της προ-οξειδωτικής τοξικότητας των φλαβονοειδών περιλαμβάνει το μεταβολισμό τους από τις πολυάριθμες υπεροξειδάσες, που καταλύουν την οξειδωση των πολυφαινολών. Για παράδειγμα, η μυελο-υπεροξειδάση του πλάσματος καταλύει την παραγωγή των προ-οξειδωτικών φαινοξυλικών ριζών, οι οποίες καταλύουν την οξειδωση των λιπο-πρωτεϊνών, των πρωτεϊνών διασύνδεσης κ.λπ., και με αυτόν τον τρόπο συμβάλλουν στον αρτηριοσκληρυντικό μηχανισμό. Οι ενδοκυτταρικές φαινοξυλικές ρίζες, που διαμορφώνονται από τη μυελό-υπεροξειδάση, προκαλούν επίσης την υπεροξείδωση των λιπιδίων και ταυτοχρόνως συν-οξειδώνουν την GSH ή το NADH, με τη συνακόλουθη ενεργοποίηση του οξυγόνου (εκτενή πρόσληψη οξυγόνου και σχηματισμό ριζικών ανιόντων του σουπεροξειδίου), (Giuseppe Galati et al.,2002).



Εικόνα 1.11. Μοριακοί μηχανισμοί της προ-οξειδωτικής δράσης των φλαβονοειδών.



Εικόνα 1.11.2. Πιθανός μηχανισμός στον οποίο οφείλεται η μεταλλαξιγόνος δράση της κερκετίνης υπό in vitro συνθήκες.

1.6.4. Αντιμεταλλαξιγόνος δράση των φυτικών πολυφαινολών.

Υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός αναφορών των αντιμεταλλαξιγόνων επιδράσεων των πολυφαινολών, οι οποίες εξαρτώνται από τις σχέσεις δομής και δράσης. Σε πολλές περιπτώσεις, εάν μια ένωση είναι αντιμεταλλαξιγόνος ή όχι εξαρτάται όχι μόνο από την ακριβή χημική φύση του μορίου, αλλά και από τον τρόπο που μελετάται, καθώς και από το εάν η πολυφαινόλη είναι παρόν πριν, κατά τη διάρκεια ή μετά από την έκθεση στο σχετικό μεταλλαξιγόνο. Πολλές από τις χημικές ουσίες που περιγράφονται ως αντιμεταλλαξιγόνα μπορούν επίσης να ενεργήσουν ως συν-μεταλλαξιγόνα, όπως παραδείγματος χάριν η βανιλίνη και το ταννικό οξύ (Lynnette R. Ferguson, 2000).

Υπάρχουν διάφοροι διαφορετικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται με τις αντιμεταλλαξιγόνες δράσεις των πολυφαινολών, όπως :

1. Επίδραση στη σύνθεση του DNA.

Οι πολυφαινόλες μπορούν να επιδράσουν στη σύνθεση του DNA, είτε έμμεσα (μέσω της σύνδεσης μετάλλων), είτε άμεσα (S. Uddin and M.A. Choudhry et al., 1995). Για μερικές πολυφαινόλες η επίδραση αυτή παρατηρείται σε καρκινικά κύτταρα, αλλά όχι και στα αντίστοιχα φυσιολογικά τους. Εντούτοις, ούτε τα δομικά χαρακτηριστικά που είναι απαραίτητα για αυτήν την επίδραση, ούτε οι μηχανισμοί που εμπλέκονται δεν γίνονται απολύτως κατανοητά, και δεν είναι απαραίτητως ίδια σε ολόκληρη την ομάδα των πολυφαινολών.

2. Επίδραση στην επιδιόρθωση του DNA.

Διάφορες φαινολικές ενώσεις, ειδικά οι απλούστερες από αυτές, συμπεριλαμβανομένου της βανιλίνης, της κουμαρίνης και του ταννικού οξέως, θεωρούνται ότι ενεργούν ως αντιμεταλλαξιγόνα, τροποποιώντας την αντιγραφή του DNA ή/και την επιδιόρθωσή του, μετά από βλάβη που προκαλείται από μεταλλαξιγόνα (T. Ohta, 1993). Ορισμένες πολυφαινόλες μπορούν άμεσα να επηρεάσουν τη λειτουργία των ενζύμων επιδιόρθωσης του DNA, τροποποιώντας την έκφραση των γονιδίων. Παραδείγματος χάριν, το φλαβονοειδές μυρεκετίνη εμφανίστηκε να ενισχύει την αφαίρεση ιδιαίτερα μεταλλαξιγόνων προϊόντων οξειδωσης από το DNA σε ηπατοκύτταρα στα οποία είχε εφαρμοστεί ένα άλας σιδήρου, μέσω εξαρτώμενης από τη δόση επαγωγής της έκφρασης του γονιδίου της β-πολυμεράσης (V. Abalea et al., 1999).

3. Επίδραση στη δέσμευση μεταλλαξιγόνων στο DNA.

Μόνο ένας περιορισμένος αριθμός μελετών σε ζώα είναι διαθέσιμος, για να εξεταστεί εάν οι πολυφαινόλες μπορούν να αποτρέψουν το σχηματισμό συμπλεγμάτων DNA-adducts *in vivo*. Ένα παράδειγμα αποτελεί το ελλαγικό οξύ, που βρέθηκε να αναστέλλει την επαγόμενη από την N-νιτροσο-μεθυλουρία (NMU) μεταλλαξιγένεση, αναστέλλοντας τη μεθυλίωση στην Ο6 θέση της γουανίνης, μέσω ενός μηχανισμού αλληλεπίδρασης του ελλαγικού οξέως με το DNA λόγω συγγένειας.

4. Αναστολή της τοποισομεράσης.

Το ελλαγικό οξύ είναι ένας ισχυρός ανασταλτικός παράγοντας των καταλυτικών δραστηριοτήτων της τοποισομεράσης I και II, μιας και τις εμποδίζει από το να σταθεροποιήσουν το σύμπλεγμα για το κόψιμο του DNA, δρώντας επομένως ως ανταγωνιστές τους (A. Constantinou et al., 1995).

5. Επίδραση στην απορρόφηση μεταλλαξιγόνων.

Οι λιγνίνες είναι πολυμερή συμπλέγματα τριών διαστάσεων των φαινυλπροπανοικών καταλοίπων. Οι λιγνίνες φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων, είναι συνήθως δεσμευμένες με ετεροξυλάνες (κύριοι μη κυτταρικοί πολυσακχαρίτες). Η σουμπερίνη είναι ένα ακόμα πιο σύνθετο πολυμερές μόριο, που θεωρείται ότι έχει μια περιοχή δέσμευσης καταλοίπων που ομοιάζει με αυτή της λιγνίνης. Τα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα που περιέχουν λιγνίνη ή σουμπερίνη, έχουν την ισχυρή δυνατότητα να προσροφούν τα υδροφοβικά

μεταλλαξιγόνα και έχει προταθεί ότι μπορούν να προστατεύσουν ζώα ή ανθρώπους από τη μεταλλαξιγένεση, με τη μεταφορά τέτοιων υλικών μέσω του γαστροεντερικού σωλήνα. Παρόμοιες επιδράσεις είναι πιθανό να έχουν και πολυφαινόλες υψηλού μοριακού βάρους.

6. *Επίδραση στη νιτροσυλίωση.*

Αν και μερικές φαινόλες μπορούν να ενισχύσουν τη νιτροσυλίωση, άλλες εμφανίζονται να εμποδίζουν αυτήν την διαδικασία. Το γαλλικό και ταννικό οξύ μειώνουν την μεταλλαξιγένεση που προκαλεί η Ν-μέθυλο-νιτροουρία (MNU) και Ν-μέθυλο-Ν'-νίτρο-Ν-νιτροσογουανιδίνη (MNNG) στο τεστ του Ames, μέσω επιδράσεων στο pH και επίσης μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του μεταλλαξιγόνου και του αντιμεταλλαξιγόνου. Άλλες επιδράσεις στη μεταλλαξιγένεση που προκαλείται από Ν-νιτρισό ενώσεις μπορεί να οφείλονται σε άμεση παρέμβαση στη διαδικασία της με νιτροσυλίωσης. Για παράδειγμα, το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ αντέδρασαν γρήγορα και ολοκληρωτικά με ισο-μοριακή ποσότητα νιτρώδους άλατος του νατρίου σε διάλυμα μιμούμενο του γαστρικού υγρού, γι'αυτό και προτάθηκε ότι δρουν ως αντι-καρκινογόνα μέσω της αναστολής του σχηματισμού των Ν-νιτρισό ενώσεων (Lynnette R. Ferguson, 2000).

1.7. Κερκετίνη.

Η κερκετίνη είναι μια πολυφαινολική φυτική χρωστική ουσία κίτρινου χρώματος, που ευρέως διαδεδομένη στα φύλλα, το φλοιό και τους σπόρους των φυτών. Από την ανακάλυψη των βιο-φλαβονοειδών το 1936 και μετά, περισσότερα από 2.000 επιστημονικά άρθρα δημοσιεύθηκαν για την κερκετίνη, κάνοντας την ένα από τα πιο εκτενώς μελετημένα θρεπτικά φυτικά συστατικά.

Η κερκετίνη είναι ο σημαντικότερος εκπρόσωπος της υποκατηγορίας των φλαβονοειδών που ονομάζονται φλαβονόλες. Αποτελεί ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό, μιας και μπορεί να σχηματίζει χηλικές ενώσεις με μέταλλα, να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και να αποτρέπει την οξειδωση της λιπο-πρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) in vitro (Peter C. H. Hollman et al., 1997). Επίσης, είναι αποτελεσματικός αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης και της λιπο-οξειγονάσης. Η οξειδάση της ξανθίνης εμπλέκεται, όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, σε πολλές παθολογικές διαδικασίες όπως στις αντιδράσεις φλεγμονής, στην αρτηριοσκλήρυνση, στον καρκίνο και στη γήρανση, ενώ η λιπο-οξειγονάση επάγει την οξειδωση των LDL, που παίρνουν μέρος στην εξέλιξη τόσο της αρτηριοσκλήρυνσης όσο και του καρκίνου (Andrea J. Day et al., 2000). Η κερκετίνη μπορεί επομένως να συμβάλει στην πρόληψη της αρτηριοσκλήρυνσης. Πράγματι, η πρόσληψη των φλαβονολών συνδέεται αντιστρόφως ανάλογα με τις καρδιαγγειακές παθήσεις σε αρκετές, εν τούτοις όχι σε όλες, τις υποψήφιες επιδημιολογικές μελέτες (Peter C. H. Hollman et al., 1997).

Η κερκετίνη έχει ένα ευρύ φάσμα αντικαρκινικών ιδιοτήτων, συμπεριλαμβανομένης της παρεμπόδισης της αύξησης των κυττάρων που προέρχονται από ανθρώπινους καρκίνους όπως εκείνοι του στομαχιού, του κόλον, του προστάτη και του μαστού. Επιπλέον, καταστέλλει την αύξηση και την εξέλιξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, των μελανωμάτων και των εντερικών όγκων σε ποντίκια (George J. Soleas et al., 2002).

1. 8. Κατεχίνη και Επικατεχίνη.

Η κατεχίνη βρίσκεται σε φρούτα και λαχανικά, και μαζί με την οικογένεια των συγγενών της ενώσεων, αποτελεί την κύρια πολυφαινόλη του πράσινου τσαγιού, το οποίο έχει αναγνωριστεί ως ποτό με ιδιαίτερη αντικαρκινική δυνατότητα. Η (+)-κατεχίνη εμποδίζει αποτελεσματικά την αύξηση των ανθρώπινων κυτταρικών σειρών που προέρχονται από καρκίνους του προστάτη και του μαστού, καθώς επίσης εμποδίζει και την προκληθείσα από καπνό καρκινογένεση σε ηπατοκύτταρα αρουραίων (George J. Soleas et al., 2002).

Τα μονομερή των κατεχινών, (+)-κατεχίνη και (-)-επικατεχίνη, απορροφώνται με τη μορφή μεταβολιτών τους. Οι καρδιοπροστατευτικές επιδράσεις τους προέρχονται από τη δυνατότητα που έχουν να εμποδίζουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων, να σχηματίζουν χηλικές ενώσεις με τα οξειδοαναγωγικώς-ενεργά μέταλλα και να αναστέλλουν οξειδωτικές διαδικασίες στις οποίες εμπλέκονται ενεργές ρίζες οξυγόνου (Cyril Auger et al., 2004).

Η επικατεχίνη είναι μια φλαβανόλη που ανήκει στην οικογένεια των κατεχινών και είναι συνήθως παρούσα σε μονομερή ή /και ολιγομερή μορφή στο πράσινα τσάι, το κόκκινο κρασί, τα προϊόντα κακάο και στα διάφορα φρούτα. Οι επιδημιολογικές μελέτες προτείνουν έναν συσχετισμό μεταξύ της κατανάλωσης φλαβονοειδών, συμπεριλαμβανομένων και των κατεχινών, και της μειωμένης εμφάνισης στεφανιαίων καρδιακών παθήσεων και του καρκίνου. Προσφάτως, η προσοχή είχε εστιαστεί στα πιθανά νευροπροστατευτικά αποτελέσματα των φλαβονοειδών, ενάντια στα νευρωνικά ελλείμματα που συνδέονται με τη γήρανση ή τις ηλικιακές νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Έχουν διεξαχθεί κυτταρικές μελέτες που εξετάζουν του πιθανούς μηχανισμούς νευροπροστασίας από τα φλαβονοειδή, επιδεικνύοντας ότι η επικατεχίνη εμποδίζει των νευρωνικό κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από οξειδωτικό στρες, που με τη σειρά του επάγεται από οξειδωμένες χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι αυτοί οι νευροπροστατευτικοί μηχανισμοί εμπλέκουν την τροποποίηση του ενεργοποιημένου από μιτογόνο σήμα μονοπατιού μεταβίβασης σήματος της πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK) (Manal M. Abd El Mohsen et al., 2002). Επίσης, ο V. Valls-Bellés και οι συνεργάτες του μετά από μελέτη τους κατέδειξαν μια ισχυρή αντιοξειδωτική επίδραση της επικατεχίνης ενάντια στη λιπιδιακή υπεροξείδωση και μάλιστα σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0,75μM), σε ηπατοκύτταρα ποντικού. Επιπλέον έδειξαν ότι η επικατεχίνη συντηρεί τα ενδογενή αντιοξειδωτικά όπως είναι η GSH και η καταλάση, καθώς και ότι δρα ως δεσμευτής ελευθέρων ριζών εμποδίζοντας την οξείδωση που προκαλείται σε θύμο αδένα μόσχου, ο οποίος εκτίθεται σε *tert*-BOOH (V. Valls-Bellés et al., 2001). Ακόμη, έχει προταθεί ότι φλαβονοειδή, όπως η επικατεχίνη, δρουν ως εν δυνάμει δεσμευτές του NO₂ (Rüdiger Wippel et al., 2003).

1.9. Ρεσβερατρόλη.

Η ρεσβερατρόλη ήταν το κύριο συστατικό των φυτικών εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για αιώνες στην παραδοσιακή ιατρική για να θεραπεύσουν τις ανθρώπινες ασθένειες. Είναι μια βιολογικά ενεργή ένωση, η οποία ανήκει στις φυτοαλεξίνες, που αποτελούν δευτεροβάθμιους φυτικούς μεταβολίτες, οι οποίοι παράγονται *de novo* ή αυξάνεται η σύνθεσή τους ως απόκριση σε καταστάσεις στρες ή στην επίθεση από μη παθογόνα ή ατοξικά βακτηρίδια, ιούς ή μύκητες.

Η κοινότοπα ονομασμένη, ως ρεσβερατρόλη, έχει την χημική ονομασία 3,4',5-τριδροξύστιλβένιο. Υπάρχουν δύο γεωμετρικά ισομερή της ρεσβερατρόλης, το *E*- (*trans*-) και το *Z*- (*cis*-) ρεσβερατρόλη, αλλά στους φυτικούς ιστούς εμφανίζεται ένα μίγμα αυτών των δύο ισομερών με το *trans*-ισομερές να υπερισχύει συνήθως (V. Filip et al., 2002). Η ρεσβερατρόλη συντίθεται στην επιδερμίδα των φύλλων και τη φλούδα των σταφυλιών. Η συγκέντρωσή της στη φλούδα των σταφυλιών ποικίλει και το 1992 πρωτο-ανιχνεύθηκε στο κρασί. Ανιχνεύθηκε, επίσης, και σε μη-αλκοολούχους χυμούς κόκκινων σταφυλιών (Hari L. Ratan B.Med.Sci. et al., 2002).

Περισσότερα από 200 άρθρα έχουν δημοσιευθεί για τη ρεσβερατρόλη μόνο τα τελευταία έτη, που συνήθως αναφέρονται στις βιολογικές της ιδιότητες π.χ. αντιοξειδωτική επίδραση, αντι-αρτηριοσκληρυντική επίδραση, επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα, αντι-μεταλλαξιογόνο επίδραση και χήμειο-προστατευτική δράση ενάντια στην αύξηση όγκων (V. Filip et al., 2002). Λαμβάνοντας υπόψη την φυσική προέλευση της ουσίας, καθώς και το γεγονός ότι βρίσκεται σε κοινά τρόφιμα, αναμένεται να έχει χαμηλή τοξικότητα μετά από χρόνια χορήγηση, που αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό οποιασδήποτε χημειοπροστατευτικής ουσίας. Η ρεσβερατρόλη έγινε ευρέως γνωστή κατά τη διάρκεια της έρευνας για το αποκαλούμενο "γαλλικό παράδοξο". Η

ρεσβερατρόλη εμπλέκεται σε αυτό το παράδοξο, λόγω των ενεργειών της στην τροποποίηση του μεταβολισμού λιπιδίων, της αγγειοδιασταλτικής της δραστηριότητας, και της παρεμπόδισης που προκαλεί στη συνάθροιση των αιμοπεταλίων (Hari L. Ratan B.Med.Sci. et al., 2002). Επίσης, αποτελεί, πιο ισχυρό από τη βιταμίνη Ε, αντιοξειδωτικό όσον αφορά την παρεμπόδιση της LDL οξειδωσης (Li-Man Hung et al., 2000).

1.10. Ελλαγικό οξύ.

Το ελλαγικό οξύ βρίσκεται σε αφθονία σε φυτά όπως τα μούρα, οι φράουλες, τα βατόμουρα, τα καρύδια, αλλά οι μέγιστες συγκεντρώσεις του έχουν παρατηρηθεί στα μούρα. Επίσης, ενώ τα φύλλα αυτών των φυτών περιέχουν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις του ελλαγικού οξέος, η ένωση βρίσκεται και στα φρούτα και στα κουκούτσια τους.

Εξυπηρετεί διάφορες πιθανές λειτουργίες στα φυτά, ρυθμίζοντας την αύξηση τους, τη βλάστηση σπόρου, και τους παρέχει προστασία από μικροβιακές μολύνσεις, από καρκινογόνες χημικές ουσίες, από τη δηλητηρίαση των βαρέων μετάλλων, καθώς και από τα έντομα και τις προνύμφες εντόμων. Από την αρχή της δεκαετίας του '90, οι ερευνητές είχαν ανακαλύψει ότι το ελλαγικό οξύ προσφέρει οφέλη στην υγεία των ανθρώπων (www.ellagicacidresearch.org).

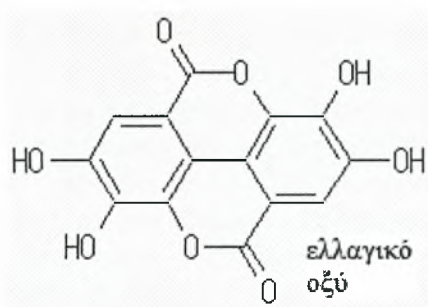
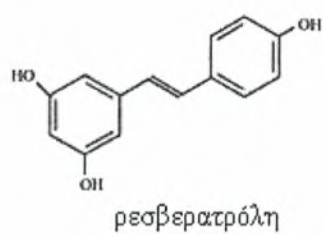
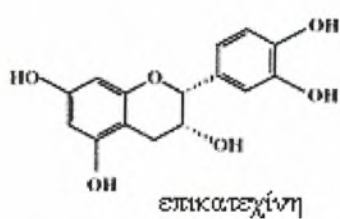
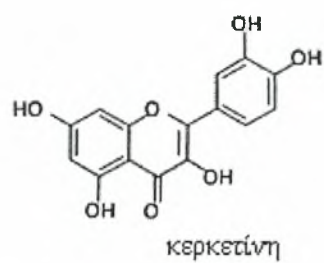
Στη φύση, το ελλαγικό οξύ υπάρχει στην ελεύθερη μορφή του και ως σύμπλοκο υπό τη μορφή ελλαγιταννινών, οι οποίες υδρολύονται εύκολα. Συνεπώς, μικρά ποσά ελλαγιταννινών που προέρχονται από φυσικές πηγές μπορεί να είναι αποτελεσματικότερα στην ανθρώπινη διατροφή από ότι οι μεγάλες δόσεις του καθαρισμένου ελλαγικού οξέος (Alexander C Whitley et al., 2003).

Το ελλαγικό οξύ ήταν αποτελεσματικό ενάντια σε όγκους του ισοφάγου σε αρουραίους σε μελέτες που έγιναν *in vivo*, η δόση όμως που χορηγήθηκε ήταν υψηλότερη από την αναμενόμενη που προσλαμβάνεται μέσω της δίαιτας (Alexander C Whitley et al., 2003).

Το ελλαγικό οξύ, επίσης, έχει μια σειρά από ιδιότητες που έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντικές για τη μείωση των επιπτώσεων του καρκίνου σε πειραματικά μοντέλα. Ορισμένες από αυτές τις ιδιότητες αναφέρονται παρακάτω:

- ενεργοποιεί ένζυμα αποτοξίνωσης στο συκώτι έχοντας ως αποτέλεσμα το καθαρισμό του ορού από χημικά μεταλλαξιογόνα που προκαλούν καρκίνο
- εμποδίζει τη δέσμευση των καρκινογόνων στο κυτταρικό DNA
- δρα ως αντιοξειδωτικό δεσμεύοντας υψηλής ενεργότητας ελεύθερες ρίζες οξυγόνου
- επάγει την απόπτωση (τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο) σε καρκινικά κύτταρα
- ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα για την καταστροφή καρκινικών κυττάρων (www.ellagicacidresearch.org).

Έχει επιβεβαιωθεί ότι η ουδέτερη μορφή του ελλαγικού οξέος που είναι παρούσα σε pH 5,5 δεσμεύεται στη διπλή έλικα του DNA. Σε υψηλότερες τιμές του pH καθόλου ή ένα πολύ μικρό μέρος της ποσότητας του ελλαγικού οξέος δεσμεύεται στο DNA. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η απευθείας αλληλεπίδραση μεταξύ του ελλαγικού οξέος και του DNA πρέπει να λαμβάνεται υπόψη για την εκτίμηση των μηχανισμών στους οποίους οφείλονται οι παρατηρούμενες βιολογικές επιδράσεις αυτής της φυτικής φαινόλης (Peter W. Thulstrup et al., 1999).



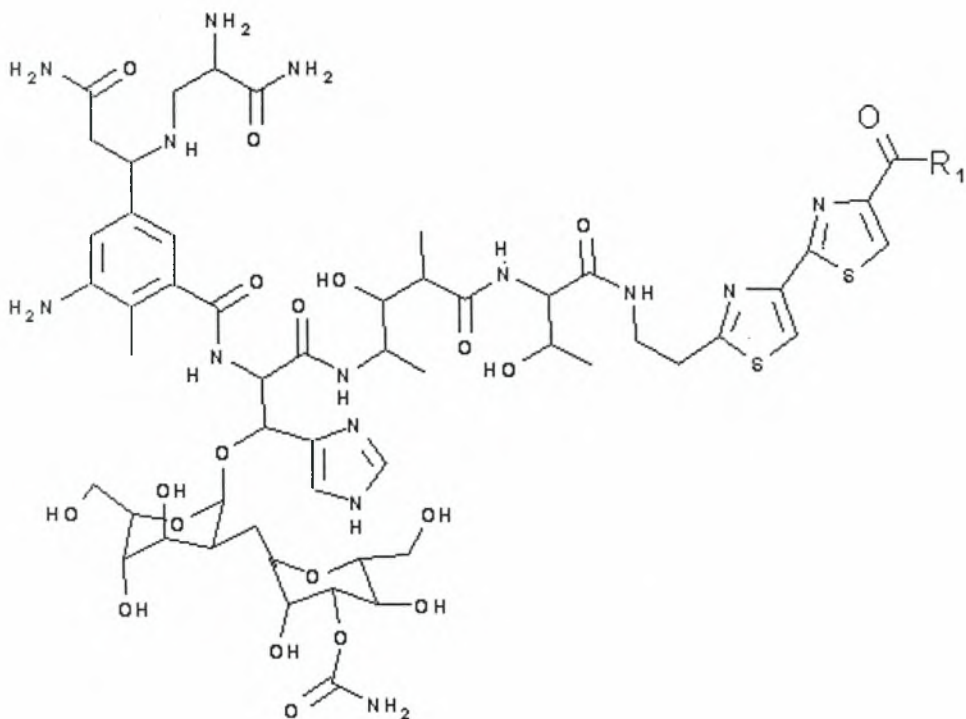
Εικόνα 1.12. Χημική δομή των φυτικών πολυφαινολών: κερκετίνη, κατεχίνη, επικατεχίνη, ρεσβερατρόλη και ελλαγικό οξύ.

1.11. Μπλεομυκίνη.

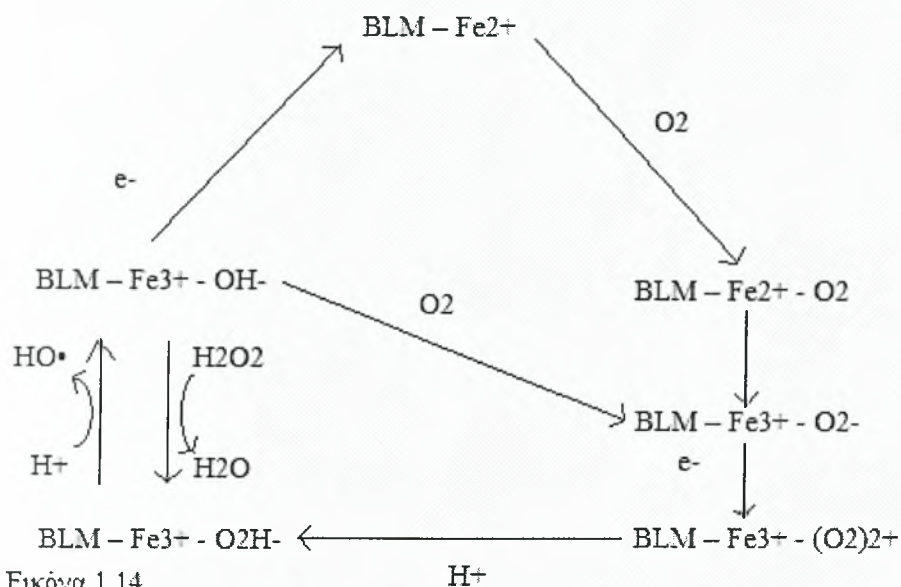
Το όνομα μπλεομυκίνη αντιπροσωπεύει μια οικογένεια από γλυκοπεπτίδια που παίζουν το ρόλο των αντιβιοτικών και τα οποία παράγονται από τον *Streptomyces verticillus*. Οι μπλεομυκίνες είναι δραστικές ενάντια διαφόρων καρκίνων του ανθρώπου και δρουν μέσω της δέσμευσης τους στο DNA. Προκαλούν μονόκλωνα και κάποια δίκλωνα σπασίματα καθώς και αποικοδόμηση του σακχάρου δεοξυριβόζη προς σχηματισμό διαφόρων προϊόντων, που με τη σειρά τους αποικοδομούνται απελευθερώνοντας την τρισανθρακική αλδεϋδη μαλονδιαλδεϋδη (MDA – three carbon aldehyde malondialdehyde). Το MDA μέσα από συγκεκριμένες αντιδράσεις δίνει χρωμογόνες ενώσεις, που βοηθούν στην ανίχνευση των σπασμάτων στο DNA που προκαλεί η μπλεομυκίνη (B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge – Free Radicals in Biology and Medicine, 1989).

Η μπλεομυκίνη (BLM) φαίνεται ότι αποτελεί ιδανικό στοιχείο κατά τη μελέτη τόσο της βλάβης όσο και της επιδιόρθωσης του DNA (Stagos et al., 2004), λόγω του ραδιο-μιμητικού της χαρακτήρα αλλά και εξαιτίας της διαδεδομένης χρήσης της στη θεραπεία πολλών τύπων καρκίνου. Η αντικαρκινογόνος δράσης της συνδέεται με τη δυνατότητα της να διακόπτει την κυτταρική διαίρεση, λόγω των προαναφερόμενων βλαβών που προκαλεί στην έλικα του DNA (Paweł Jałoszy et al., 1997).

Οι μπλεομυκίνες είναι πολύ ισχυροί δεσμευτές ιόντων των μεταβατικών μετάλλων, όπως είναι τα Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , χορηγώντας ηλεκτρόνια από άτομα αζώτου και σχηματίζοντας μία $>\text{C}=\text{O}$ ομάδα με το μεταλλικό ιόν. Η αποικοδόμηση του DNA από την μπλεομυκίνη απαιτεί οπωσδήποτε την παρουσία ενός οξειδωτικού ιόντος μεταβατικού μετάλλου στο σύμπλεγμα DNA-μπλεομυκίνης. Επίσης, απαραίτητο είναι το O_2 . In vivo, μόνο ο σίδηρος και πιθανώς και ο χαλκός, φαίνεται να διαμεσολαβούν στην επαγόμενη από την μπλεομυκίνη βλάβη του DNA. Προσθέτοντας άλας δισθενούς σιδήρου στην μπλεομυκίνη ή μειώνοντας τα σύμπλοκα της μπλεομυκίνης με τον τρισθενή σίδηρο με αναγωγικά βιολογικά μόρια (ασκορβικό, γλουταθειόνη) ή με συστήματα που παράγουν ρίζες σουπεροξειδίου (O_2^-), μπορεί να επιτευχθεί η παραγωγή συμπλόκων αποικοδόμησης DNA-μπλεομυκίνης- Fe^{2+} . Επώαση της μπλεομυκίνης απουσία DNA με ένα άλας Fe^{2+} σε υδατικό διάλυμα προκαλεί τον σχηματισμό ριζών σουπεροξειδίου και υδροξυλικών ριζών, με αποτέλεσμα το ίδιο το φάρμακο να υφίσταται χημική τροποποίηση που οδηγεί σε καταστροφή της δράσης του (κυρίως μέσω των υδροξυλικών ριζών). Η προσθήκη όμως DNA παρεμποδίζει την προαναφερόμενη χημική τροποποίηση. Εν αντιθέσει, δεσμευτές ριζών οξυγόνου (π.χ. δισμουτάση του σουπεροξειδίου, καταλάση, βιταμίνη E), προσφέρουν μικρή έως ελάχιστη προστασία στο DNA, απέναντι στη βλάβη που του προκαλεί το δεσμευμένο σε αυτό σύμπλοκο της μπλεομυκίνης με το Fe^{2+} . Ακόμη, κάποια φαινολικά αντιοξειδωτικά μπορούν να οδηγήσουν σε μεγαλύτερη βλάβη ανάγοντας τον τρισθενή σίδηρο του συμπλόκου σε δισθενή (B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge – Free Radicals in Biology and Medicine, 1989).



Εικόνα 1.13. Χημική δομή της μπλεομυκίνης.



Εικόνα 1.14

Μηχανισμός της δράσης της μπλεομυκίνης (BLM).

(B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge - Free Radicals in Biology and Medicine, 1989).

1.12. Σκοπός του πειράματος.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανακάλυψη πιθανών μηχανισμών στους οποίους οφείλεται η χημειοπροστατευτική και αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εκχυλισμάτων των σταφυλιών και των φυτικών πολυφαινολών που περιέχουν. Για το σκοπό αυτό εξετάστηκε η επίδραση εκχυλισμάτων και κλασμάτων ελληνικών ποικιλιών αμπέλου καθώς και καθαρών πολυφαινολών σε μεταλλάξεις που προκαλούνται μέσω ελευθέρων ριζών σε προκαρυωτικά κύτταρα. Υπάρχουν αρκετά πειραματικά δεδομένα που αποδεικνύουν ότι οι ελεύθερες ρίζες και το οξειδωτικό στρες, εμπλέκονται στην αιτιολογία ενός πλήθους εκφυλιστικών ασθενειών συμπεριλαμβανομένης της καρδιαγγειακής πάθησης, του διαβήτη, του καρκίνου, των νευροεκφυλιστικών διαταραχών και της γήρανσης. Η πιθανή αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εκχυλισμάτων σταφυλιών ενάντια στη μεταλλαξιγένεση από ελεύθερες ρίζες είναι εξέχουσας σημασίας, διότι ως φυτικά συστατικά θα μπορούσαν μέσω της δίαιτας να δρουν χημειοπροστατευτικά.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Υλικά.

Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των εταιρειών Sigma (Η.Π.Α.), Merck (Γερμανία) και Pancreac (Ισπανία). Η μπλεομυκίνη ήταν προϊόν της εταιρείας Nippon Kayaku (Ιαπωνία).

Οργανισμοί

Χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Salmonella typhimurium* TA102.

Εκχυλίσματα

Χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα (μεθανολικό και υδατικό) από δύο ποικιλίες αμπέλου (*Vitis vinifera*). Η μία ποικιλία ονομάζεται *Ασύρτικο Σαντορίνης* (άσπρα σταφύλια) και η δεύτερη *Μανδηλαριά Σαντορίνης* (κόκκινα σταφύλια). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής κλάσματα από την ποικιλία *Μανδηλαριά Σαντορίνης*:

- α) Μεθανολικό κλάσμα από μεθανολικό εκχύλισμα
- β) Μεθανολικό κλάσμα από υδατικό εκχύλισμα
- γ) Κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) από υδατικό εκχύλισμα

Η απομόνωση των εκχυλισμάτων και των κλασμάτων έγινε στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυτικών Προϊόντων της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

2.2. Μέθοδοι.

Δοκιμή του Ames

2.2.1α Γενικά

Το τεστ του Ames, το οποίο αναπτύχθηκε το 1975 από τον Bruce Ames και τους συνεργάτες του, είναι μια ευρέως αποδεκτή μικρής διάρκειας (short-term) βακτηριακή δοκιμή για τον προσδιορισμό των ουσιών που μπορούν να προκαλέσουν γενετική βλάβη, η οποία οδηγεί σε γονιδιακές μεταλλάξεις. Το τεστ χρησιμοποιεί έναν αριθμό από στελέχη του βακτηριδίου *Salmonella typhimurium* με προϋπάρχουσες μεταλλάξεις, που καθιστούν τα βακτηρίδια ανίκανα να συνθέσουν το απαραίτητο αμινοξύ, ιστιδίνη, και επομένως ανίκανα να αυξηθούν και να σχηματίσουν αποικίες σε θρεπτικό υλικό από το οποίο απουσιάζει η ιστιδίνη. Νέες μεταλλάξεις (επαναμεταλλάξεις), στο γονίδιο της ιστιδίνης ή σε κοντινή περιοχή εντός του γονιδίου, μπορούν να αποκαταστήσουν τη λειτουργία του γονιδίου και να επιτρέψουν στα κύτταρα τη σύνθεση ιστιδίνης. Αυτά τα επαναμεταλλαγμένα κύτταρα μπορούν να αυξηθούν απουσία ιστιδίνης και να σχηματίσουν αποικίες. Για αυτόν τον λόγο, το τεστ αναφέρεται συχνά ως 'δοκιμή επαναφοράς' (reversion test).

Τα στελέχη *Salmonella* που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή έχουν διαφορετικές μεταλλάξεις στα διάφορα γονίδια στο οπερόνιο της ιστιδίνης, και κάθε μια από αυτές τις μεταλλάξεις έχει σχεδιαστεί ώστε να ανταποκρίνεται στα διάφορα μεταλλαξιγόνα που ενεργούν μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Οι επιπρόσθετες μεταλλάξεις που κατασκευάστηκαν σε αυτά τα στελέχη, είχαν ως σκοπό να τα καταστήσουν πιο ευαίσθητα στην ευρεία ποικιλία των υπό εξέταση ουσιών.

Το τεστ του Ames σχεδιάστηκε συγκεκριμένα για να ανιχνεύει τη χημικά επαγόμενη μεταλλαξιογένεση. Το τεστ χρησιμοποιείται διεθνώς ως μια αρχική ένδειξη, για τον καθορισμό της μεταλλαξιογόνου δυνατότητας των νέων χημικών ουσιών και των φαρμάκων, μιας και η λήψη μιας μεταλλαξιογόνου απάντησης μπορεί να προβλέψει σε υψηλό ποσοστό την καρκινογένεση σε πειραματόζωα από αυτές τις ουσίες.

Η δοκιμή μεταλλαξιογένεσης εξελίχθηκε κατά τη διάρκεια των ετών μέσω της αρχικής διαλογής των διάφορων μεταλλάξεων της ιστιδίνης που οδήγησαν στην επιλογή αυτών που ήταν ιδιαίτερα ευαίσθητες στην επαναφορά από ποικίλα χημικά μεταλλαξιογόνα. Επειδή τα βακτηρίδια δεν έχουν τη δυνατότητα να μεταβολίζουν τις χημικές ουσίες μέσω των κυτοχρωμάτων P450, όπως τα θηλαστικά και τα άλλα σπονδυλωτά, ένα βασικό συστατικό που στην πορεία κατέστησε ιδιαίτερως χρήσιμη τη βακτηριακή δοκιμή μεταλλαξιογένεσης ήταν η προσθήκη ενός εξωγενούς μεταβολικού συστήματος που μετατρέπει ουσίες χωρίς μεταλλαξιογόνο δράση στους μεταβολίτες τους που έχουν μεταλλαξιογόνο δράση.

Το συγκεκριμένο τεστ χρησιμοποιείται και για την ανίχνευση ουσιών με αντιμεταλλαξιογόνο δράση. Για το σκοπό αυτό σε κάποιες καλλιέργειες κυττάρων προστίθεται μια ουσία που προκαλεί μεταλλάξεις και η οποία αυξάνει τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων που παρατηρείται σε καλλιέργειες στις οποίες δεν έχει προστεθεί καμία ουσία, και σε κάποιες άλλες καλλιέργειες προστίθεται η ουσία που προκαλεί μεταλλάξεις μαζί με την υπό εξέταση ουσία. Αν στην δεύτερη περίπτωση ο αριθμός των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων είναι μικρότερος από ότι στις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο την μεταλλαξιογόνο ουσία, πιθανώς να προκύψει (αν η μείωση είναι στατιστικά σημαντική) το συμπέρασμα ότι η εξεταζόμενη ουσία έχει αντιμεταλλαξιογόνο δράση.

Στέλεχος *Salmonella typhimurium* TA102.

Όλα τα στελέχη *Salmonella* που χρησιμοποιούνται στο τεστ του Ames είναι εξαρτώμενα από την ιστιδίνη λόγω μετάλλαξης στο οπερόνιο της, ενώ διαφέρουν στις πρόσθετες μεταλλάξεις, οι οποίες έχουν καταστήσει τα στελέχη πιο ευαίσθητα σε διάφορες κατηγορίες χημικών μεταλλαξιογόνων.

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα είναι το TA102. Σε αυτό το στέλεχος, όπως και σε όλα τα υπόλοιπα, υπάρχει μια μετάλλαξη (*rfa*) που έχει ως συνέπεια ένα ελαττωματικό στρώμα λιποπολυσακχαρίτη (LPS), το οποίο περιβάλλει τη βακτηριδιακή επιφάνεια, με αποτέλεσμα τα βακτήρια να είναι περισσότερο διαπερατά από τα μεγάλου μοριακού βάρους χημικά μόρια. Ακόμη, η εισαγωγή του πλασμιδίου pKM101 στο TA102 ενισχύει την χημική και επαγόμενη από UV μεταλλαξιογένεση, μέσω αύξησης στη δράση του μονοπατιού επιδιόρθωσης του μη ομόλογου ανασυνδιασμού του DNA, που είναι επιρρεπές σε λάθη. Το πλασμίδιο, επίσης, παρέχει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, η οποία είναι ένας κατάλληλος δείκτης για την ανίχνευση της παρουσίας του pKM101 στα στελέχη.

Η εισαγωγή της μετάλλαξης *hisG428* στα πολλαπλά αντίγραφα του πλασμιδίου pAQ1 (το πλασμίδιο περιέχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη) που έχει εισαχθεί στα στελέχη TA102, έχει ως σκοπό των πολλαπλασιασμό των θέσεων που είναι ευαίσθητες στη μεταλλαξιογένεση. Για την ενίσχυση τη δυνατότητας αυτών των στελεχών να ανιχνεύουν τα στοιχεία που δια-συνδέονται με το DNA, το γονίδιο *uvrB* διατηρήθηκε, με αποτέλεσμα να παραμένει ικανή η βακτηριδιακή επιδιόρθωση του DNA. (Μετάλλαξη διαγραφής του *uvrB* περιορίζει τον ακριβή μηχανισμό επιδιόρθωσης αποκοπής βάσεων, επιτρέποντας τη διόρθωση του μεγαλύτερου μέρους των βλαβών του DNA από τον επιρρεπή σε λάθη μηχανισμό επιδιόρθωσης.)

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι περιοχές μεταλλαξιογένεσης των διαφόρων στελεχών που χρησιμοποιούνται στο τεστ του Ames περιέχουν GC ζεύγη βάσεων. Εν αντιθέσει, τα δύο στελέχη TA102 και TA104, περιέχουν AT ζεύγη βάσεων στην *hisG428* περιοχή μετάλλαξης. Η *hisG428* μετάλλαξη είναι μια μετάλλαξη λήξης, TAA, στο *hisG* γονίδιο, η οποία μπορεί να

επαναμεταλλαχθεί με όλες τις έξι πιθανές αλλαγές ζευγών βάσεων (τόσο μεταβάσεις όσο και μεταπτώσεις). Την μετάλλαξη, στο στέλεχος TA102, φέρουν τα πολλαπλά αντίγραφα του πλασμιδίου pAQ1 που περιέχει. Το πλασμίδιο, όπως έχει προαναφερθεί, παρέχει ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη, η οποία αποτελεί κατάλληλο δείκτη για την ανίχνευση του (Kristien Mortelmans and Errol Zeiger, 2000). Επιπροσθέτως, το στέλεχος TA102, ανιχνεύει μια ποικιλία από οξειδωτικά μεταλλαξιγόνα, συμπεριλαμβανομένων των ακτίνων X, της μπλεομυκίνης, του υπεροξειδίου του υδρογόνου, της μιτομυκίνης C, της υπεριώδους ακτινοβολίας και πολλών άλλων, και συνεπώς ανιχνεύει μια ποικιλία από οξειδωτικές και άλλες ουσίες ως μεταλλαξιγόνα, τα οποία δεν ανιχνεύονταν από τα άλλα πριν από αυτό στέλεχος (Danid. E. Levin et al., 1982).

2.2.1β Καλλιεργητικά υλικά και χημικά αντιδραστήρια

Διάλυμα αλάτων Vogel-Bonner 50X (VB salts): για την παρασκευή 1 lt προστίθενται 10 gr $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 100 gr κιτρικό οξύ, 500 gr K_2HPO_4 , 175 gr $\text{Na}_2\text{NH}_2\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ σε απεσταγμένο νερό. Μετά την παρασκευή το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο για 15 λεπτά στους 120°C .

Διάλυμα γλυκόζης (10% v/v): για την παρασκευή 1 lt προστίθενται 100 gr γλυκόζης σε 1000 ml απεσταγμένο νερό. Μετά την παρασκευή το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο για 15 λεπτά στους 120°C .

Ελάχιστο θρεπτικό άγαρ γλυκόζης ή bottom άγαρ: για την παρασκευή 1 lt προστίθενται 15 gr άγαρ σε 930 ml απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια αποστειρώνεται το άγαρ σε αυτόκαυστο για 15 λεπτά στους 120°C . Μετά την αποστείρωση το άγαρ αφήνεται να κρυώσει για 45 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 65°C . Τέλος, προστίθενται 20 ml διαλύματος VB salts και 50 ml διαλύματος γλυκόζης (10% v/v).

Διάλυμα Ιστιδίνης / Βιοτίνης (0,5 mM): για την παρασκευή 1 lt προστίθενται 124 mg D-βιοτίνης, 96 mg L-ιστιδίνης και 1000 ml απεσταγμένο νερό. Μετά την παρασκευή το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο για 15 λεπτά στους 120°C .

Τορ άγαρ: για την παρασκευή 1 lt προστίθενται 6 gr άγαρ, 6 gr NaCl, 100 ml διαλύματος Ιστιδίνης / Βιοτίνης σε απεσταγμένο νερό. Μετά την παρασκευή το τορ άγαρ αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο για 15 λεπτά στους 120°C .

Θρεπτικό υλικό για την καλλιέργεια *S. typhimurium*: προστίθενται 8 gr Nutrient Broth (Merck) σε 1000 ml απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο για 15 λεπτά στους 120°C .

2.2.1γ Πειραματική διαδικασία

Καλλιέργεια κυττάρων *S. typhimurium*

Τα βακτηρίδια της *S. typhimurium* αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό Nutrient Broth (Merck). 200 μl αιωρήματος *S. typhimurium*, που έχει αποθηκευτεί στους -70°C με 50% γλυκερόλη, προστίθεται σε 30 ml θρεπτικού υλικού και τα κύτταρα αναπτύσσονται στους 37°C για 10-14 ώρες μέχρι να φτάσουν σε πυκνότητα $1-2 \times 10^9$ μονάδες παραγωγής αποικιών (A_{540} : 0.1-0.2).

Κανονική μέθοδος κατά Ames (standard plate incorporation assay)

100 μl της καλλιέργειας των κυττάρων προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 10 ml στους οποίους έχουν ήδη προστεθεί 2 ml λιωμένο τορ άγαρ, 50 μl διαλύματος bleomycin (10 μg/ml) και 50 μl διαλύματος της υπό εξέταση ουσίας σε διάφορες συγκεντρώσεις. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες διατηρούνται στους 45°C σε υδατόλουτρο. Η διατήρηση αυτής της θερμοκρασίας είναι σημαντική για την πειραματική διαδικασία γιατί κάτω από τους 43°C πήζει το τορ άγαρ ενώ πάνω από τους 48°C σκοτώνονται τα κύτταρα. Ακολουθεί ανάμιξη του περιεχομένου των σωλήνων με ήπια ανάδευση (για να μην καταστραφούν τα κύτταρα) σε vortex

και στη συνέχεια το top άγαρ απλώνεται σε τριβλία που περιέχουν 25 ml πηγμένο bottom άγαρ. Όταν το top άγαρ πήξει (2-3 λεπτά) τα τριβλία τοποθετούνται ανεστραμμένα σε επώαστικό κλίβανο στους 37 °C για 48 ώρες. Μετά την επώαση γίνεται η καταμέτρηση των επαναμεταλλαγμένων αποικιών σε κάθε τριβλίο. Για την εξέταση κάθε ουσίας έγιναν δύο πειράματα και στο καθένα ετοιμάστηκαν τρία τριβλία για κάθε συγκέντρωση. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκε ένας αρνητικός μάρτυρας (καλλιέργειες στις οποίες δεν προστέθηκε καμία ουσία) και ένας θετικός μάρτυρας (καλλιέργειες στις οποίες προστέθηκε μόνο μπλεομυκίνη).

Έλεγχος κυτταροτοξικότητας

Μετά την επώαση των κυττάρων κάθε τριβλίο ελέγχεται για την εμφάνιση κυτταροτοξικότητας. Ο έλεγχος γίνεται με παρατήρηση των τριβλίων σε οπτικό μικροσκόπιο (40X μεγέθυνση) για να διαπιστωθεί αν στα τριβλία υπάρχουν εκτός από τις επαναμεταλλαγμένες αποικίες που σχηματίζονται από μη εξαρτώμενα από ιστιδίνη κύτταρα (αυτές οι αποικίες είναι ορατές με γυμνό μάτι) και μικροαποικίες που σχηματίζονται από εξαρτώμενα από ιστιδίνη κύτταρα. Απουσία των παραπάνω μικροαποικιών ή μείωση της πυκνότητάς τους είναι ένδειξη κυτταροτοξικότητας.

Στατιστική ανάλυση

Για να υπολογιστεί, αν η διαφορά μεταξύ του μέσου όρου του αριθμού των αποικιών στις καλλιέργειες που είχαν προστεθεί οι εξεταζόμενες ουσίες και του μέσου όρου στις καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες (στις οποίες είχε προστεθεί μόνο μπλεομυκίνη), ήταν στατιστικά σημαντική χρησιμοποιήθηκε το Student t – test. Σε αυτή τη μέθοδο υπολογίζεται ένα διάστημα εμπιστοσύνης (C.I.) μεταξύ δύο μέσων όρων. Αν το C.I. περιέχει το μηδέν η διαφορά τους δεν είναι στατιστικά σημαντική. Αν το C.I. δεν περιέχει το μηδέν η διαφορά τους είναι στατιστικά σημαντική.

Η αλγεβρική σχέση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του διαστήματος εμπιστοσύνης είναι:

$$(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) \pm t_{(1-a/2)} \sqrt{(s_p^2/n_1) + (s_p^2/n_2)} \quad (1)$$

\bar{x}_1, \bar{x}_2 : οι δύο μέσοι όροι

n_1, n_2 : το πλήθος του δείγματος (στο συγκεκριμένο πείραμα $n_1 = n_2 = 6$)

a : δείχνει την % πιθανότητα η διαφορά μεταξύ των δύο μέσων όρων να είναι στατιστικά σημαντική. Για 95% στατιστικά σημαντική διαφορά, η τιμή του a ισούται με 0,05

$t_{(1-a/2)}$: είναι το κριτήριο της t -κατανομής του Student και για βαθμούς ελευθερίας $df = n_1 + n_2 - 2$ υπολογίζεται από την καταχωρημένη τιμή του t στον πίνακα 2.

s_p^2 : υπολογίζεται από την εξίσωση (2)

$$s_p^2 = [(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2]/(n_1+n_2-2) \quad (2)$$

s_1, s_2 : είναι οι τυπικές αποκλίσεις για κάθε δείγμα.

2.2.3. Υπολογισμός της % αναστολής της μεταλλαξιγένεσης.

Ο υπολογισμός έγινε με βάση την ακόλουθη εξίσωση:

$$\% \text{ αναστολή} = \left\{ 1 - \frac{[(\text{αριθμός αποικιών στις καλλιέργειες με blm} + \text{εξεταζόμενη ουσία}) - (\text{αριθμός αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες})]}{[(\text{αριθμός αποικιών στις καλλιέργειες-θετικοί μάρτυρες}) - (\text{αριθμός αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες})]} \right\} \times 100$$

Πίνακας 2. Κατανομή t .

d.f.	$t_{.90}$	$t_{.95}$	$t_{.975}$	$t_{.99}$	$t_{.995}$
1	3.078	6.3138	12.706	31.821	63.657
2	1.886	2.9200	4.3027	6.965	9.9248
3	1.638	2.3534	3.1825	4.541	5.8409
4	1.533	2.1318	2.7764	3.747	4.6041
5	1.476	2.0150	2.5706	3.365	4.0321
6	1.440	1.9432	2.4469	3.143	3.7074
7	1.415	1.8946	2.3646	2.998	3.4995
8	1.397	1.8595	2.3060	2.896	3.3554
9	1.383	1.8331	2.2622	2.821	3.2498
10	1.372	1.8125	2.2281	2.764	3.1693
11	1.363	1.7959	2.2010	2.718	3.1058
12	1.356	1.7823	2.1788	2.681	3.0545
13	1.350	1.7709	2.1604	2.650	3.0123
14	1.345	1.7613	2.1448	2.624	2.9768
15	1.341	1.7530	2.1315	2.602	2.9467
16	1.337	1.7459	2.1199	2.583	2.9208
17	1.333	1.7396	2.1098	2.567	2.8982
18	1.330	1.7341	2.1009	2.552	2.8784
19	1.328	1.7291	2.0930	2.539	2.8609
20	1.325	1.7247	2.0860	2.528	2.8453
21	1.323	1.7207	2.0796	2.518	2.8314
22	1.321	1.7171	2.0739	2.508	2.8188
23	1.319	1.7139	2.0687	2.500	2.8073
24	1.318	1.7109	2.0639	2.492	2.7969
25	1.316	1.7081	2.0595	2.485	2.7874
26	1.315	1.7056	2.0555	2.479	2.7787
27	1.314	1.7033	2.0518	2.473	2.7707
28	1.313	1.7011	2.0484	2.467	2.7633
29	1.311	1.6991	2.0452	2.462	2.7564
30	1.310	1.6973	2.0423	2.457	2.7500
35	1.3062	1.6896	2.0301	2.438	2.7239
40	1.3031	1.6839	2.0211	2.423	2.7045
45	1.3007	1.6794	2.0141	2.412	2.6896
50	1.2987	1.6759	2.0086	2.403	2.6778
60	1.2959	1.6707	2.0003	2.390	2.6603
70	1.2938	1.6669	1.9945	2.381	2.6480
80	1.2922	1.6641	1.9901	2.374	2.6388
90	1.2910	1.6620	1.9867	2.368	2.6316
100	1.2901	1.6602	1.9840	2.364	2.6260
120	1.2887	1.6577	1.9799	2.358	2.6175
140	1.2876	1.6558	1.9771	2.353	2.6114
160	1.2869	1.6545	1.9749	2.350	2.6070
180	1.2863	1.6534	1.9733	2.347	2.6035
200	1.2858	1.6525	1.9719	2.345	2.6006
∞	1.282	1.645	1.96	2.326	2.576

3. Αποτελέσματα.

3.1. Επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

Σχεδιάστηκε καμπύλη που απεικονίζει τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών ανάλογα με τη συγκέντρωση της μπλεομυκίνης ανά τριβλίο. Οι συγκεντρώσεις της μπλεομυκίνης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0, 0,1, 0,5 και 1,5 μg ανά τριβλίο, και ο αριθμός των επαναμεταλλαγμένων κυττάρων που παρατηρήθηκε ήταν 251, 346, 633 και 928 αντίστοιχα. Η συγκέντρωση που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί στο πείραμα ήταν η 0,5 μg ανά τριβλίο, γιατί βρισκόταν μέσα στη γραμμική περιοχή της καμπύλης και έδινε ως επαγωγή τον κατάλληλο αριθμό επαναμεταλλαγμένων αποικιών ανά τριβλίο (σχήμα 3.1.1.).

3.2. Επίδραση των διαλυτών στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

Η μεθανόλη, το DMSO και η αιθανόλη χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες για τα αντιοξειδωτικά που δεν ήταν διαλυτά στο νερό. Οι διαλύτες εξετάστηκαν ως προς την επίδρασή τους στην επαγόμενη από την μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση, σε συγκέντρωση που ισούται με τη μεγαλύτερη που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα.

Η μεθανόλη εξετάστηκε σε συγκέντρωση 0,25 % v/v απουσία μπλεομυκίνης και βρέθηκε ότι δεν έχει καμία επίδραση στον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών. Στην ίδια συγκέντρωση παρουσία μπλεομυκίνης βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει τη μεταλλαξιγόνο δράση του οξειδωτικού (πιν. 3.1.2, σχήμα 3.2.2).

Το DMSO εξετάστηκε σε συγκέντρωση 2,5 % v/v απουσία μπλεομυκίνης και βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει σημαντικά τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών. Στην ίδια συγκέντρωση παρουσία μπλεομυκίνης βρέθηκε ότι αναστέλλει τη μεταλλαξιγόνο δράση του οξειδωτικού κατά 14% ($p < 0,05$), (πιν. 3.1.3, σχήμα 3.2.3).

Η αιθανόλη εξετάστηκε σε συγκέντρωση 0,06 % v/v απουσία μπλεομυκίνης και βρέθηκε ότι δεν έχει καμία επίδραση στον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών. Στην ίδια συγκέντρωση παρουσία μπλεομυκίνης βρέθηκε ότι επάγει τη μεταλλαξιγόνο δράση του οξειδωτικού κατά 15 % ($p < 0,05$), (πιν. 3.1.4, σχήμα 3.2.4).

3.3. Επίδραση των εξεταζόμενων ουσιών στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

Η κερκετίνη όταν εξετάστηκε απουσία μπλεομυκίνης σε συγκέντρωση 500 μM παρουσίασε τοξικότητα. Όταν εξετάστηκε παρουσία μπλεομυκίνης σε συγκεντρώσεις 5 και 50 μM βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει σημαντικά την επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση, σε συγκέντρωση 100 μM βρέθηκε ότι επάγει τη δράση της μπλεομυκίνης κατά 19% ($p < 0,05$), και σε συγκέντρωση 500 μM παρουσίασε τοξικότητα (πιν. 3.1.5, σχήμα 3.2.5, 3.3.5).

Η κατεχίνη σε συγκέντρωση 500 μM απουσία μπλεομυκίνης δεν επηρεάζει σημαντικά τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών. Όταν η ουσία εξετάστηκε σε συγκεντρώσεις 1, 10, 100 και 500 μM βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει σημαντικά την επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση (πιν. 3.1.6, σχήμα 3.2.6, 3.3.6).

Η επικατεχίνη σε συγκέντρωση 500 μM απουσία μπλεομυκίνης δεν επηρεάζει σημαντικά τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών. Όταν η ουσία εξετάστηκε σε συγκεντρώσεις 1, 10, 100 και 500 μM βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει σημαντικά την επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση (πιν. 3.1.7, σχήμα 3.2.7, 3.3.7).

Η ρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση 500 μM απουσία μπλεομυκίνης δεν επηρεάζει σημαντικά τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών. Όταν εξετάστηκε παρουσία μπλεομυκίνης σε συγκεντρώσεις 1 και 10 μM βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει σημαντικά την επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση, σε συγκεντρώσεις 100 και 500 μM βρέθηκε

ότι επάγει τη δράση της μπλεομυκίνης κατά 18% και 47% αντίστοιχα ($p < 0,05$), (πιν. 3.1.8, σχήμα 3.2.8, 3.3.8).

Το ελλαγικό οξύ όταν εξετάστηκε απουσία μπλεομυκίνης σε συγκέντρωση 500 μM παρουσίασε τοξικότητα. Όταν εξετάστηκε παρουσία μπλεομυκίνης σε συγκεντρώσεις 1, 10, και 100 μM βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει σημαντικά την επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιογένεση, και σε συγκέντρωση 500 μM βρέθηκε ότι παρουσιάζει τοξική δράση (πιν. 3.1.9, σχήμα 3.2.9, 3.3.9).

Το μεθανολικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς όταν εξετάστηκε απουσία μπλεομυκίνης σε συγκέντρωση 3 mg ανά τριβλίο παρουσίασε τοξικότητα. Όταν εξετάστηκε σε συγκεντρώσεις 0,3, 3 και 6 mg ανά τριβλίο βρέθηκε ότι αναστέλλει τη δράση της μπλεομυκίνης κατά 42%, 60% και 69% αντίστοιχα ($p < 0,05$), (πιν. 3.1.10, σχήμα 3.2.10, 3.3.10).

Το υδατικό εκχύλισμα Μανδηλαριάς όταν εξετάστηκε απουσία μπλεομυκίνης σε συγκέντρωση 3 mg ανά τριβλίο βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει σημαντικά τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών. Όταν εξετάστηκε σε συγκέντρωση 0,3 mg ανά τριβλίο βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει σημαντικά τη δράση της μπλεομυκίνης, ενώ σε συγκεντρώσεις 3 και 6 mg ανά τριβλίο αναστέλλει τη δράση του οξειδωτικού κατά 67% και 75% αντίστοιχα ($p < 0,05$), (πιν. 3.1.11, σχήμα 3.2.11, 3.3.11).

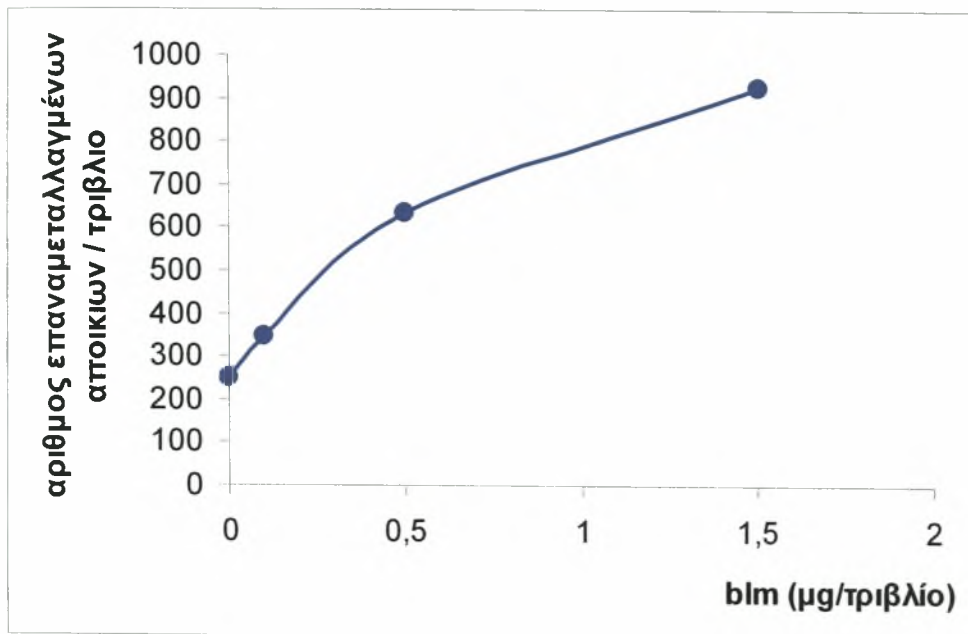
Το μεθανολικό εκχύλισμα Ασύρτικου όταν εξετάστηκε απουσία μπλεομυκίνης σε συγκέντρωση 3 mg ανά τριβλίο βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει σημαντικά τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών. Όταν εξετάστηκε σε συγκέντρωση 0,3 mg ανά τριβλίο βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει σημαντικά τη δράση της μπλεομυκίνης, ενώ σε συγκεντρώσεις 3 και 6 mg ανά τριβλίο αναστέλλει τη δράση του οξειδωτικού κατά 57% και 75% αντίστοιχα ($p < 0,05$), (πιν. 3.1.12, σχήμα 3.2.12, 3.3.12).

Το υδατικό εκχύλισμα Ασύρτικου όταν εξετάστηκε απουσία μπλεομυκίνης σε συγκέντρωση 3 mg ανά τριβλίο βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών. Όταν εξετάστηκε σε συγκέντρωση 0,3 mg ανά τριβλίο βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει σημαντικά τη δράση της μπλεομυκίνης, ενώ σε συγκεντρώσεις 3 και 6 mg ανά τριβλίο αναστέλλει τη δράση του οξειδωτικού κατά 17% και 35% αντίστοιχα ($p < 0,05$), (πιν. 3.1.13, σχήμα 3.2.13, 3.3.13).

Το μεθανολικό κλάσμα μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς απουσία μπλεομυκίνης σε συγκέντρωση 3 mg ανά τριβλίο βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει σημαντικά τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών. Όταν εξετάστηκε σε συγκεντρώσεις 0,002, 0,009, 0,03 και 0,3 mg ανά τριβλίο βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει σημαντικά την επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιογένεση, ενώ σε συγκέντρωση 3 mg ανά τριβλίο προκαλεί επαγωγή της δράσης της μπλεομυκίνης κατά 22% ($p < 0,05$), (πιν. 3.1.14, σχήμα 3.2.14, 3.3.14).

Το υδατικό κλάσμα μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς απουσία μπλεομυκίνης σε συγκέντρωση 3 mg ανά τριβλίο βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει σημαντικά τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών. Όταν εξετάστηκε σε συγκεντρώσεις 0,002, 0,009, 0,03, 0,3 και 3mg ανά τριβλίο βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει σημαντικά την επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιογένεση (πιν. 3.1.15, σχήμα 3.2.15, 3.3.15).

Το EtOAc κλάσμα υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς απουσία μπλεομυκίνης σε συγκέντρωση 3 mg ανά τριβλίο αυξάνει τον αριθμό των επαναμεταλλαγμένων αποικιών κατά 10% ($p < 0,05$). Όταν εξετάστηκε σε συγκεντρώσεις 0,002, και 0,009 mg ανά τριβλίο βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει σημαντικά τη δράση της μπλεομυκίνης, ενώ σε συγκεντρώσεις 0,03, 0,3 και 3 mg ανά τριβλίο επάγει τη μεταλλαξιογόνο δράση του οξειδωτικού κατά 29%, 50% και 43% αντίστοιχα ($p < 0,05$), (πιν. 3.1.16, σχήμα 3.2.16, 3.3.16).



Σχήμα 3.1.1. Μεταλλαξιγένεση της μπλεομυκίνης σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

Πίνακας 3.1.2. Επίδραση της μεθανόλης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

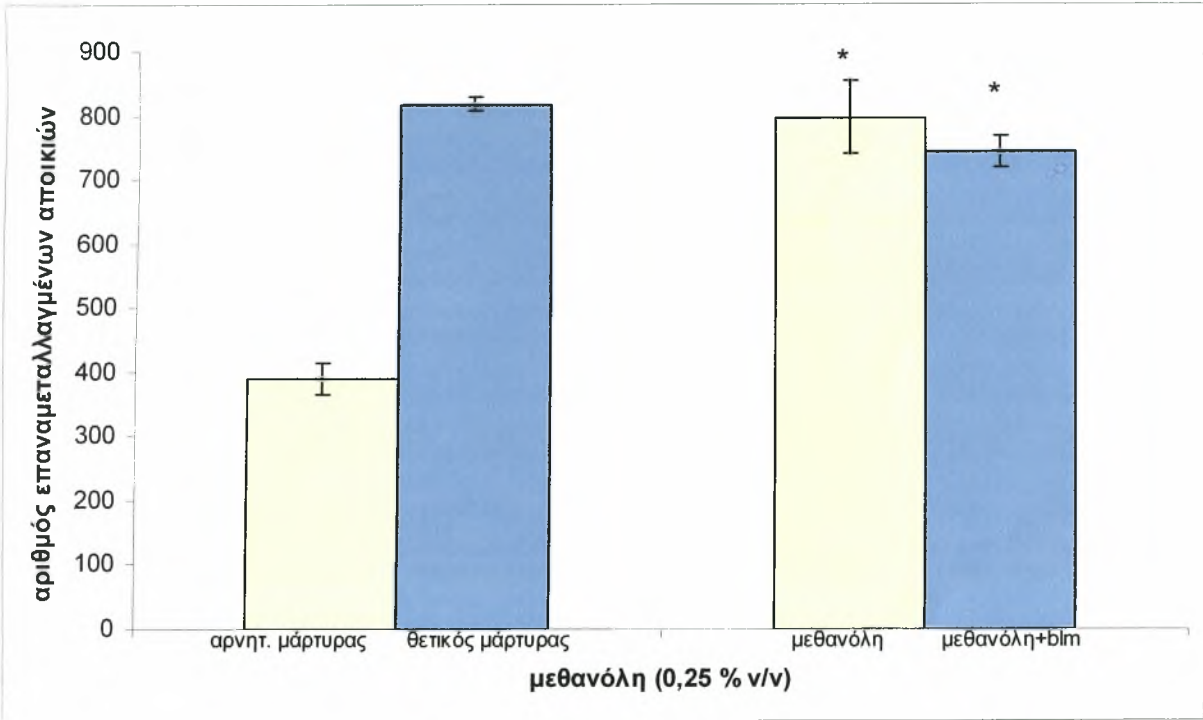
	αριθμός επαναμεταλλαγμένων αποικιών	% αναστολή/επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης ³
αρνητικός μάρτυρας	390 ± 25	
θετικός μάρτυρας-bl ^m ²	818 ¹ ± 56	
0,25% v/v μεθανόλη	797 ± 11	5 [*]
0,25% v/v μεθανόλη +bl ^m	743 ¹ ± 24	16 [*]

¹Οι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. Ο μέσος όρος προέκυψε από τις τιμές δύο πειραμάτων στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τρυβλία.

²Η συγκέντρωση της bl^m ήταν 0,5 μg / τρυβλίο.

³Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης.

^{*}Η % αναστολή/επαγωγή δεν είναι στατιστικά σημαντική.



Σχήμα 3.2.2. Επίδραση της μεθανόλης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση της bl^m ήταν 0,5 μg / τρυβλίο. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους δείχνουν την τυπική απόκλιση. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. *Τιμή στατιστικά μη σημαντική.

Πίνακας 3.1.3 Επίδραση του DMSO στην επαγόμενη από τη μπερομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

	αριθμός επαναμεταλλαγμένων αποικιών	% αναστολή/επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης ³
αρνητικός μάρτυρας	319 ± 10	
θετικός μάρτυρας-bl ^m ²	814 ¹ ± 30	
2,5% v/v DMSO	594 ± 17	10 ^{**}
2,5% v/v DMSO +bl ^m	764 ¹ ± 84	14 [*]

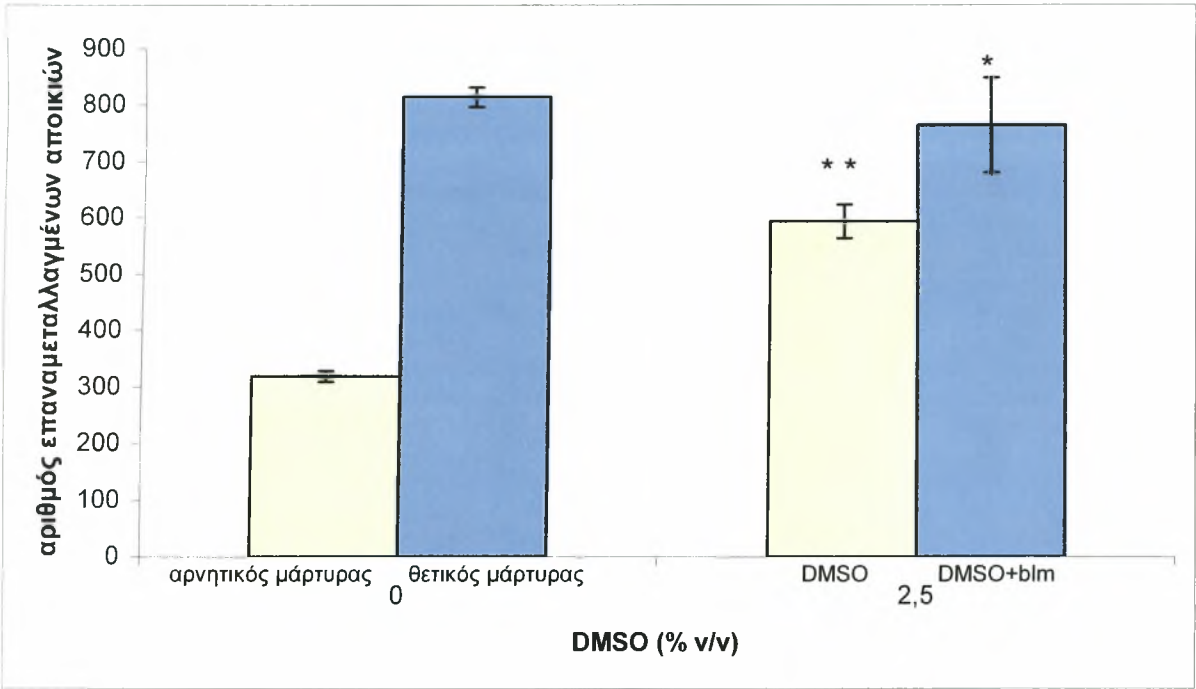
¹Οι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. Ο μέσος όρος προέκυψε από τις τιμές δύο πειραμάτων στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τρυβλία.

²Η συγκέντρωση της bl^m ήταν 0,5 μg / τρυβλίο.

³Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης.

^{*}Η % αναστολή/επαγωγή είναι στατιστικά σημαντική (p < 0,05).

^{**}Η % αναστολή/επαγωγή δεν είναι στατιστικά σημαντική.



Σχήμα 3.2.3. Επίδραση του DMSO στην επαγόμενη από τη μπερομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση της bl^m ήταν 0,5 μg / τρυβλίο. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους δείχνουν την τυπική απόκλιση. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. *Τιμή στατιστικά σημαντική (p<0,05). **Τιμή στατιστικά μη σημαντική.

Πίνακας 3.1.4. Επίδραση της αιθανόλης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

	αριθμός επαναμεταλλαγμένων αποικιών	% αναστολή/επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης ³
αρνητικός μάρτυρας	266 ± 15	
θετικός μάρτυρας-bl ^m ²	598 ¹ ± 44	
0,06% v/v αιθανόλη	573 ± 19	-9 ^{**}
0,06% v/v αιθανόλη +bl ^m	629 ¹ ± 42	-15 [*]

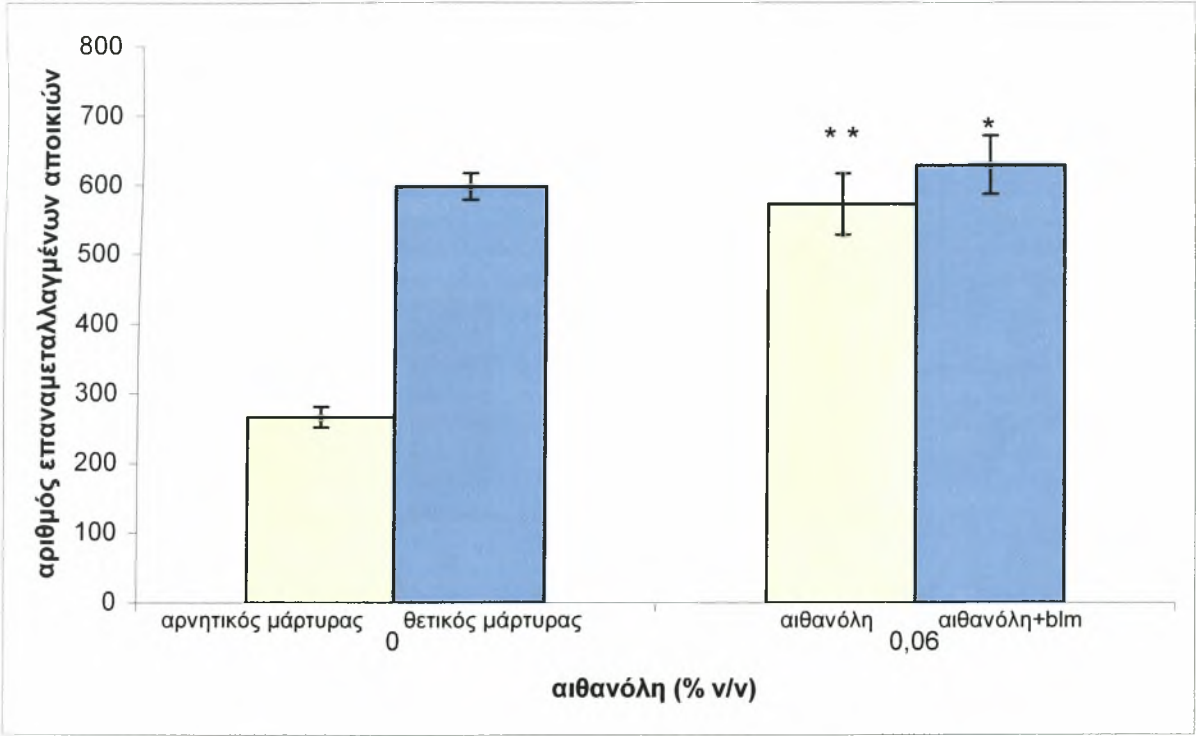
¹Οι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. Ο μέσος όρος προέκυψε από τις τιμές δύο πειραμάτων στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τρυβλία.

²Η συγκέντρωση της bl^m ήταν 0,5 μg / τρυβλίο.

³Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης.

^{*}Η % αναστολή/επαγωγή είναι στατιστικά σημαντική (p < 0,05).

^{**}Η % αναστολή/επαγωγή δεν είναι στατιστικά σημαντική.



Σχήμα 3.2.4. Επίδραση της αιθανόλης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση της bl^m ήταν 0,5 μg / τρυβλίο. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους δείχνουν την τυπική απόκλιση. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. ^{*}Τιμή στατιστικά σημαντική (p<0,05). ^{**}Τιμή στατιστικά μη σημαντική.

Πίνακας 3.1.5. Επίδραση της κερκετίνης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

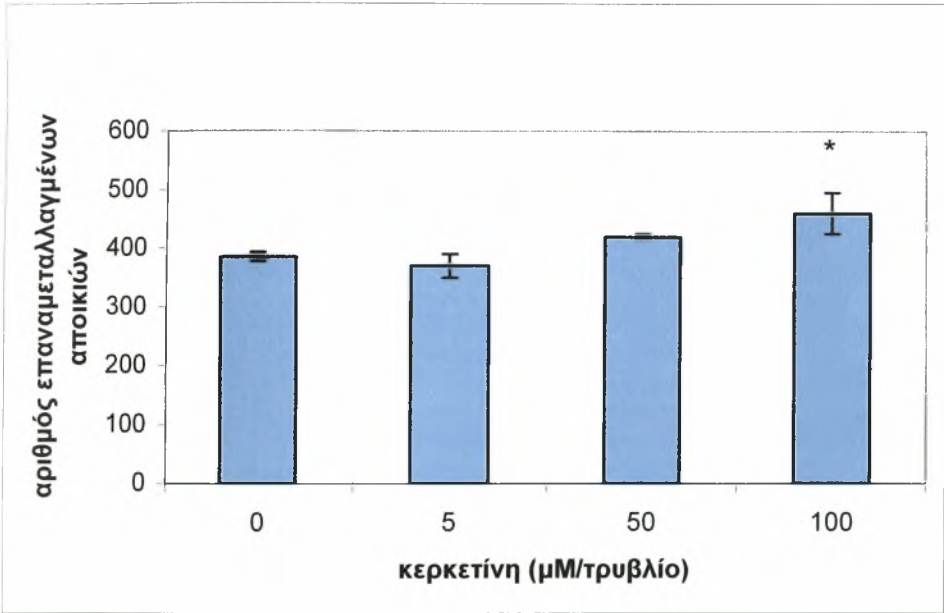
	αριθμός επαναμεταλλαγμένων αποικιών ¹	% αναστολή/επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης ³
αρνητικός μάρτυρας	320 ± 27	
θετικός μάρτυρας-blm ²	386 ± 8	
500μM κερκετίνη	τοξικότητα	
5μM κερκετίνη+blm	370 ± 20	4
50μM κερκετίνη+blm	420 ± 5	-9
100μM κερκετίνη+blm	460 ± 35	-19*
500μM κερκετίνη+blm	τοξικότητα	

¹Οι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. Ο μέσος όρος προέκυψε από τις τιμές δύο πειραμάτων στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τρυβλία.

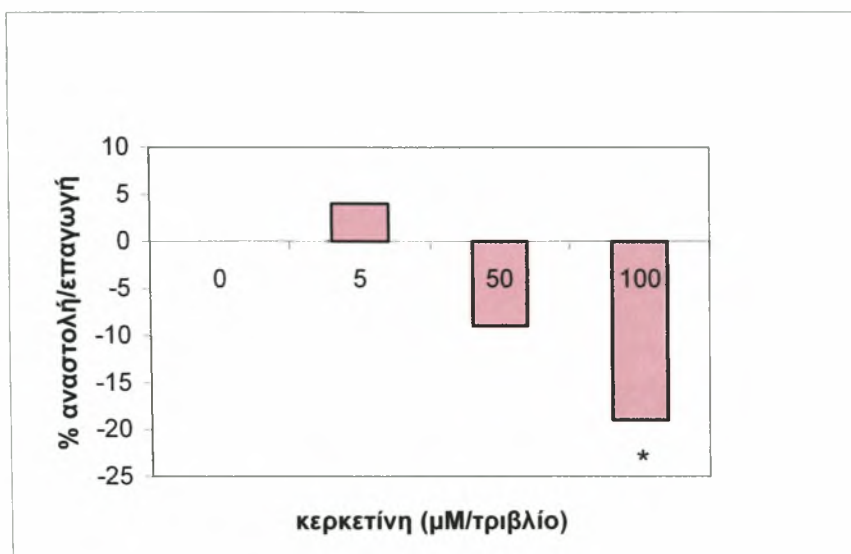
²Η συγκέντρωση της blm ήταν 0,5 μg / τρυβλίο.

³Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης.

*Η % αναστολή/επαγωγή είναι στατιστικά σημαντική (p < 0,05).



Σχήμα 3.2.5. Επίδραση της κερκετίνης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση της blm ήταν 0,5 μg / τρυβλίο. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους δείχνουν την τυπική απόκλιση. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. *Τιμή στατιστικά σημαντική (p<0,05).



Σχήμα 3.3.5. Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή της κερκετίνης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης.

*Τιμή στατιστικά σημαντική($p<0,05$).

Πίνακας 3.1.6. Επίδραση της κατεχίνης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

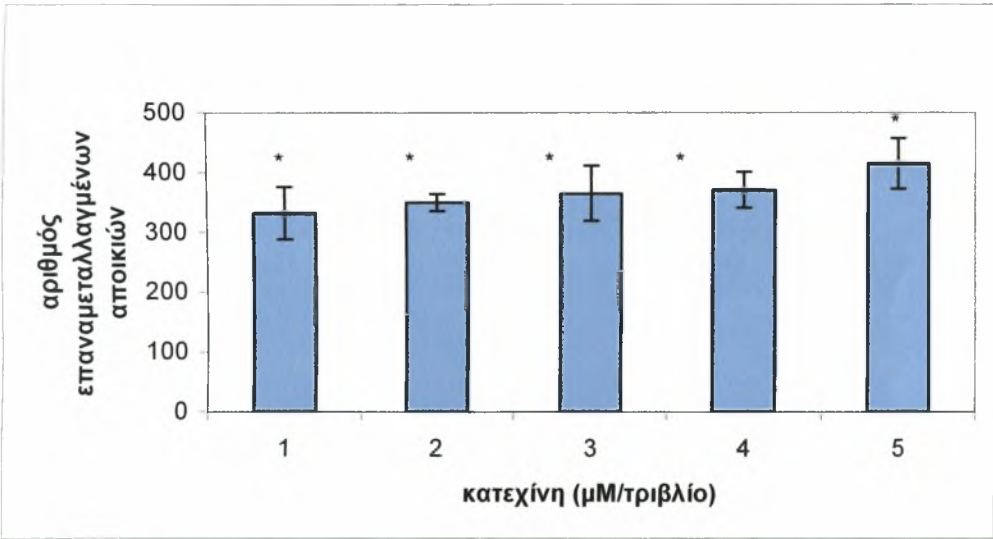
	αριθμός επαναμεταλλαγμένων αποικιών ¹	% αναστολή/επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης ³
αρνητικός μάρτυρας	266 ± 15	
θετικός μάρτυρας-blm ²	332 ± 44	
500μM κατεχίνη	277 ± 17	-17*
1μM κατεχίνη+blm	350 ± 14	- 5*
10μM κατεχίνη+blm	365 ± 46	-10*
100μM κατεχίνη+blm	371 ± 30	-12*
500μM κατεχίνη+blm	415 ± 42	-25*

¹Οι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. Ο μέσος όρος προέκυψε από τις τιμές δύο πειραμάτων στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τρυβλία.

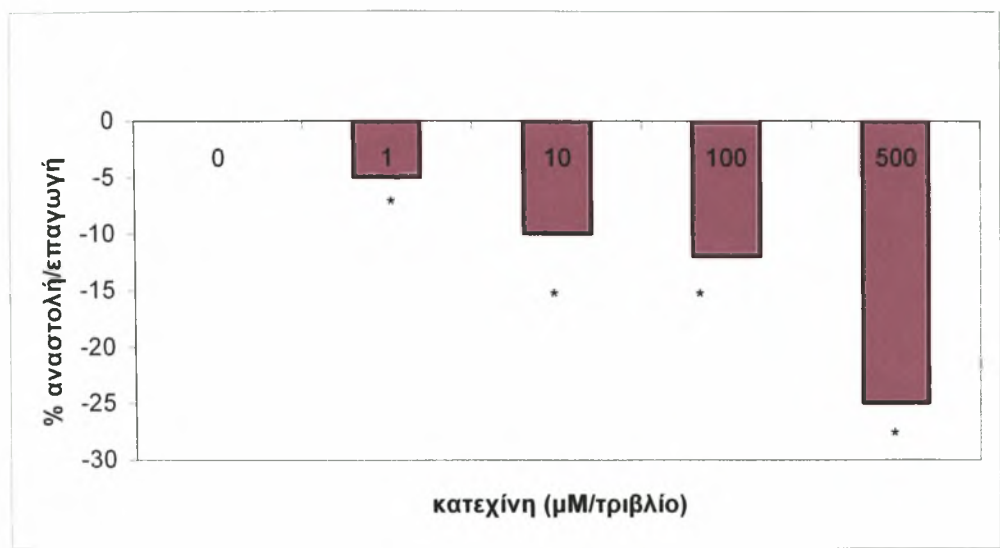
²Η συγκέντρωση της blm ήταν 0,5 μg / τρυβλίο.

³Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης.

*Η % αναστολή/επαγωγή δεν είναι στατιστικά σημαντική.



Σχήμα 3.2.6. Επίδραση της κατεχίνης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση της blm ήταν 0,5 μg / τρυβλίο. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους δείχνουν την τυπική απόκλιση. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. *Τιμή στατιστικά μη σημαντική.



Σχήμα 3.3.6. Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή της κατεχίνης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης.
*Τιμή στατιστικά μη σημαντική.

Πίνακας 3.1.7. Επίδραση της επικατεχίνης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

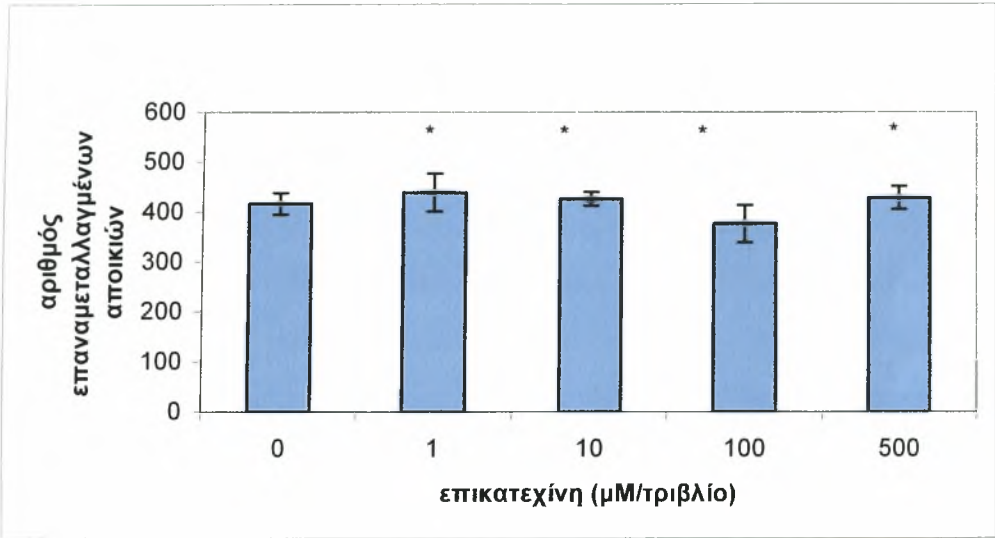
	αριθμός επαναμεταλλαγμένων αποικιών ¹	% αναστολή/επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης ³
αρνητικός μάρτυρας	373 ± 41	
θετικός μάρτυρας-blm ²	416 ± 22	
500μM επικατεχίνη	354 ± 19	15*
1μM επικατεχίνη+blm	439 ± 38	-6*
10μM επικατεχίνη+blm	426 ± 14	-2*
100μM επικατεχίνη+blm	376 ± 37	10*
500μM επικατεχίνη+blm	428 ± 23	-3*

¹ Οι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. Ο μέσος όρος προέκυψε από τις τιμές δύο πειραμάτων στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τρυβλία.

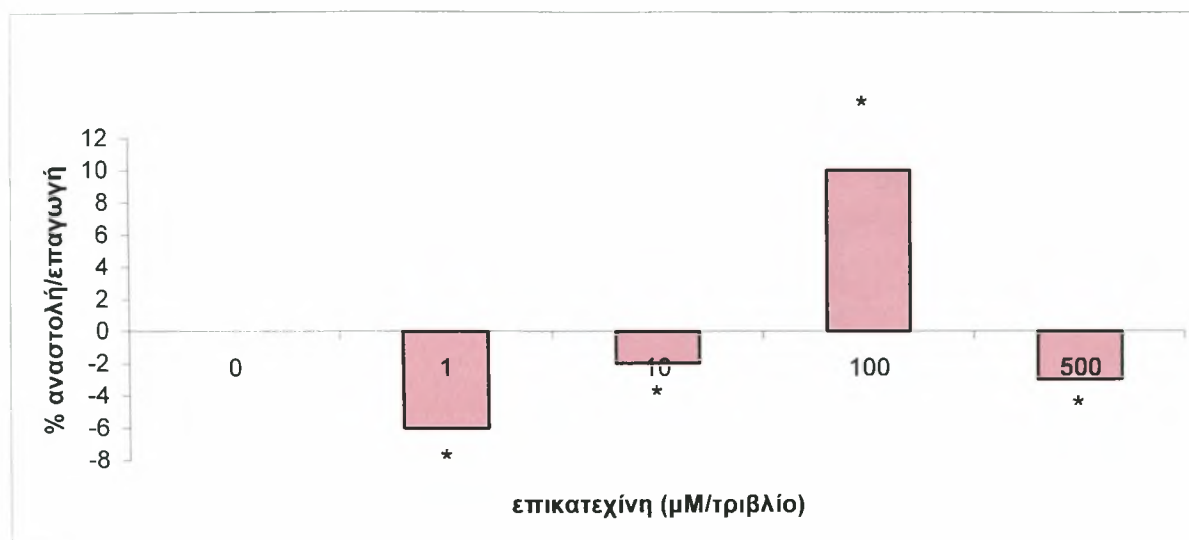
² Η συγκέντρωση της blm ήταν 0,5 μg / τρυβλίο.

³ Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης.

* Η % αναστολή/επαγωγή δεν είναι στατιστικά σημαντική.



Σχήμα 3.2.7. Επίδραση της επικατεχίνης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση της blm ήταν 0,5 μg / τρυβλίο. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους δείχνουν την τυπική απόκλιση. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. *Τιμή στατιστικά μη σημαντική.



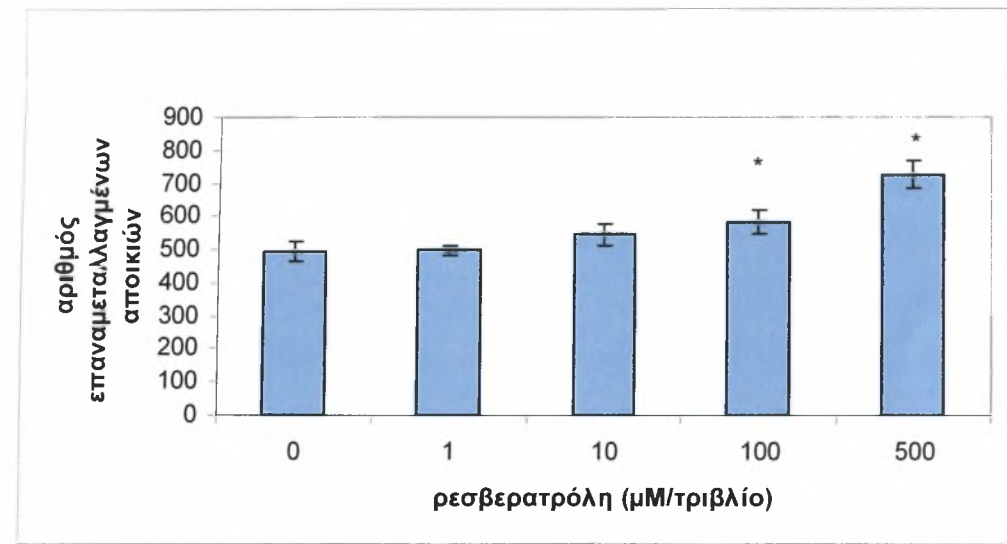
Σχήμα 3.3.7. Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή της επικατεχίνης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιογένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιογένεσης.

*Τιμή στατιστικά μη σημαντική.

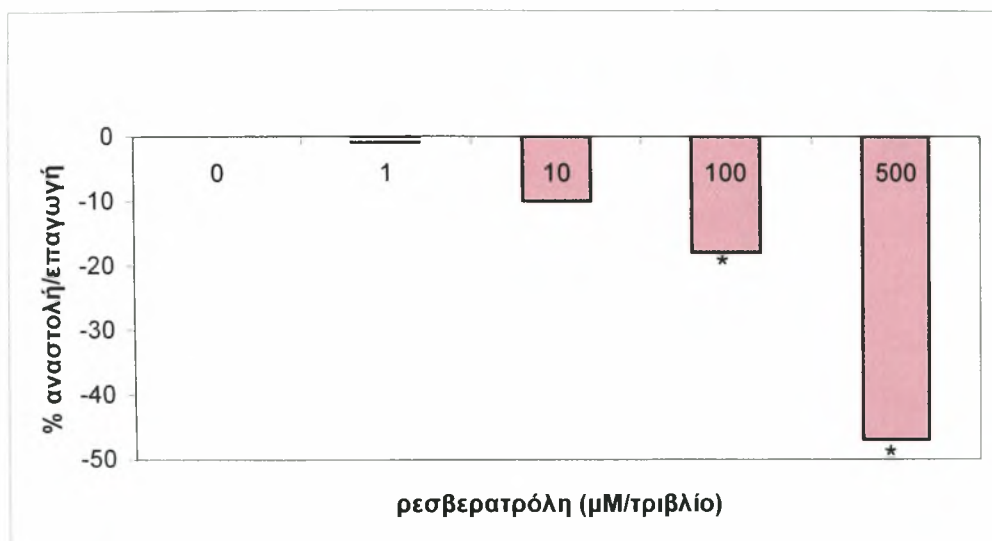
Πίνακας 3.1.8.Επίδραση της ρεσβερατρόλης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

	αριθμός επαναμεταλλαγμένων αποικιών ¹	% αναστολή/επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης ³
αρνητικός μάρτυρας	319 ± 10	
θετικός μάρτυρας-blm ²	495 ± 30	
500μM ρεσβερατρόλη	347 ± 30	-30
1μM ρεσβερατρόλη+blm	498 ± 13	- 1
10μM ρεσβερατρόλη+blm	546 ± 31	-10
100μM ρεσβερατρόλη+blm	583 ± 37	-18*
500μM ρεσβερατρόλη+blm	728 ± 40	-47*

¹Οι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. Ο μέσος όρος προέκυψε από τις τιμές δύο πειραμάτων στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τρυβλία.
²Η συγκέντρωση της blm ήταν 0,5 μg / τρυβλίο.
³Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης.
* Η % αναστολή/επαγωγή είναι στατιστικά σημαντική (p < 0,05).



Σχήμα 3.2.8. Επίδραση της ρεσβερατρόλης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση της blm ήταν 0,5 μg / τρυβλίο. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους δείχνουν την τυπική απόκλιση. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. *Τιμή στατιστικά σημαντική (p<0,05).



Σχήμα 3.3.8. Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή της ρεσβερατρόλης στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης.

*Τιμή στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$).

Πίνακας 3.1.9. Επίδραση του ελλαγιικού οξέος στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

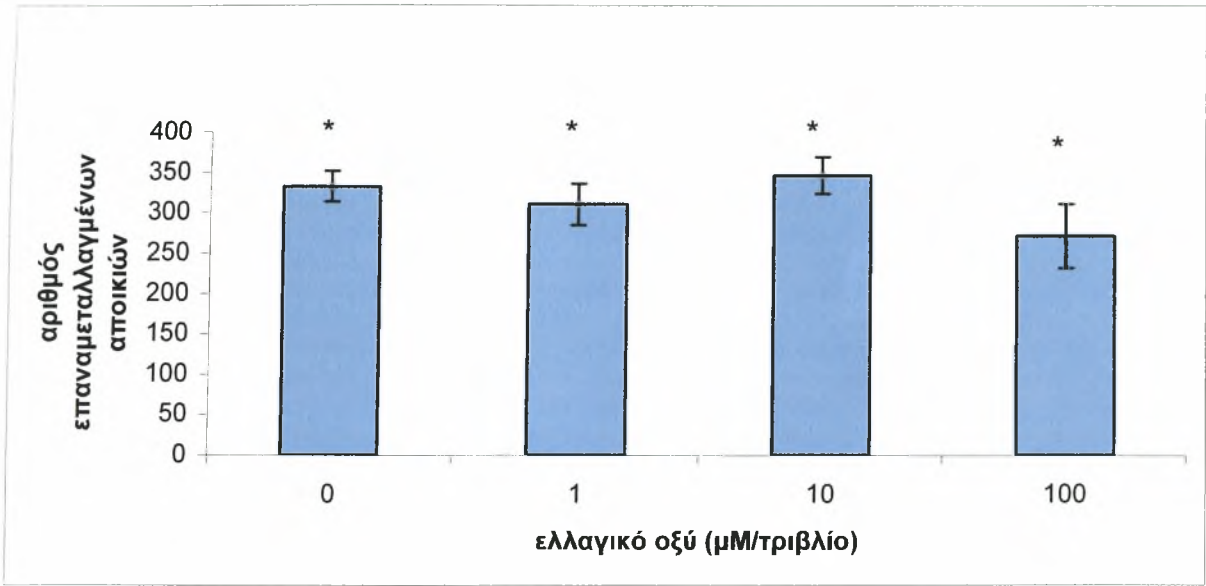
	αριθμός επαναμεταλλαγμένων αποικιών ¹	% αναστολή/επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης ³
αρνητικός μάρτυρας	369 ± 31	
θετικός μάρτυρας-bl _m ²	333 ± 19	
500μM ελλαγιικό οξύ	τοξικότητα	
1μM ελλαγιικό οξύ+bl _m	311 ± 26	7*
10μM ελλαγιικό οξύ+bl _m	347 ± 23	-4*
100μM ελλαγιικό οξύ+bl _m	272 ± 40	18*
500μM ελλαγιικό οξύ+bl _m	τοξικότητα	

¹Οι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. Ο μέσος όρος προέκυψε από τις τιμές δύο πειραμάτων στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τρυβλία.

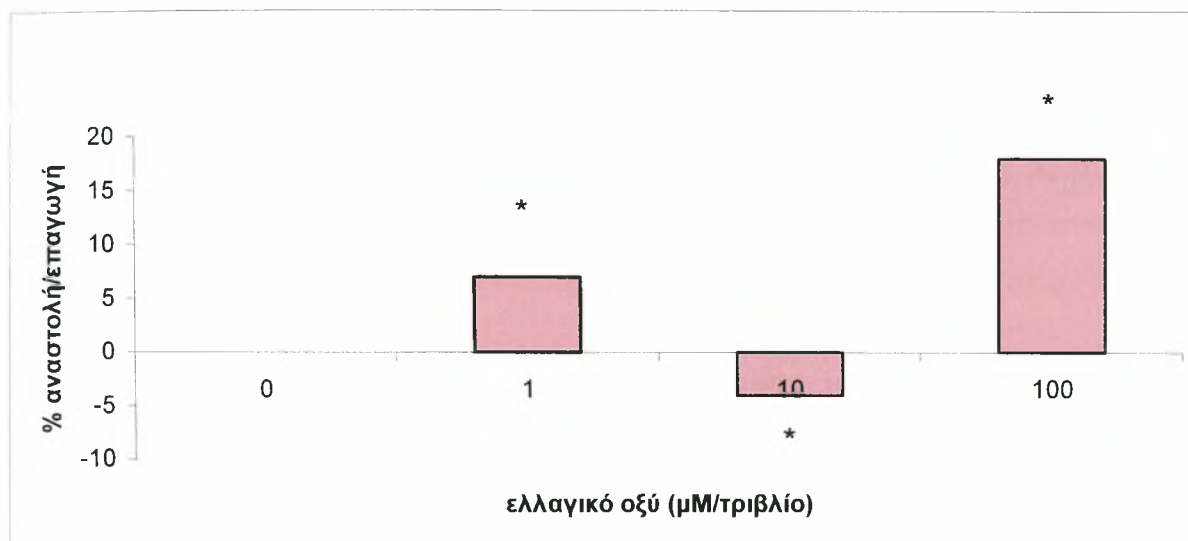
²Η συγκέντρωση της bl_m ήταν 0,5 μg / τρυβλίο.

³Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης.

*Η % αναστολή/επαγωγή δεν είναι στατιστικά σημαντική.



Σχήμα 3.2.9. Επίδραση του ελλαγιικού οξέος στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση της bl_m ήταν 0,5 μg / τρυβλίο. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους δείχνουν την τυπική απόκλιση. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. *Τιμή στατιστικά μη σημαντική.



Σχήμα 3.3.9. Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή της επικατεχίνης στην επαγόμενη από τη μπεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης.

*Τιμή στατιστικά μη σημαντική.

Πίνακας 3.1.10. Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

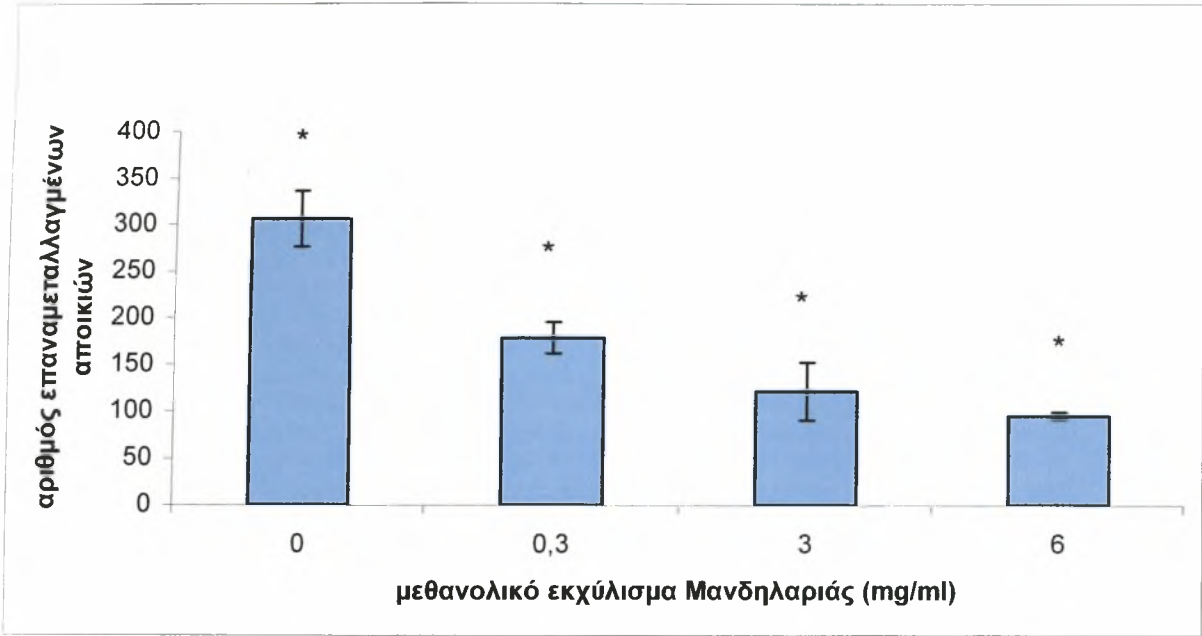
	αριθμός επαναμεταλλαγμένων αποικιών ¹	% αναστολή/επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης ³
αρνητικός μάρτυρας	360 ± 9	
θετικός μάρτυρας-blm ²	306 ± 30	
3 mg/ml μεθ.εκχ.Μανδηλαριάς	364 ± 10	-19*
0,15 mg/ml μεθ.εκχ.Μανδ.+blm	179 ± 17	42*
1,5 mg/ml μεθ.εκχ.Μανδ.+blm	122 ± 31	60*
3 mg/ml μεθ.εκχ.Μανδ.+blm	96 ± 4	69*

¹Οι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. Ο μέσος όρος προέκυψε από τις τιμές δύο πειραμάτων στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τρυβλία.

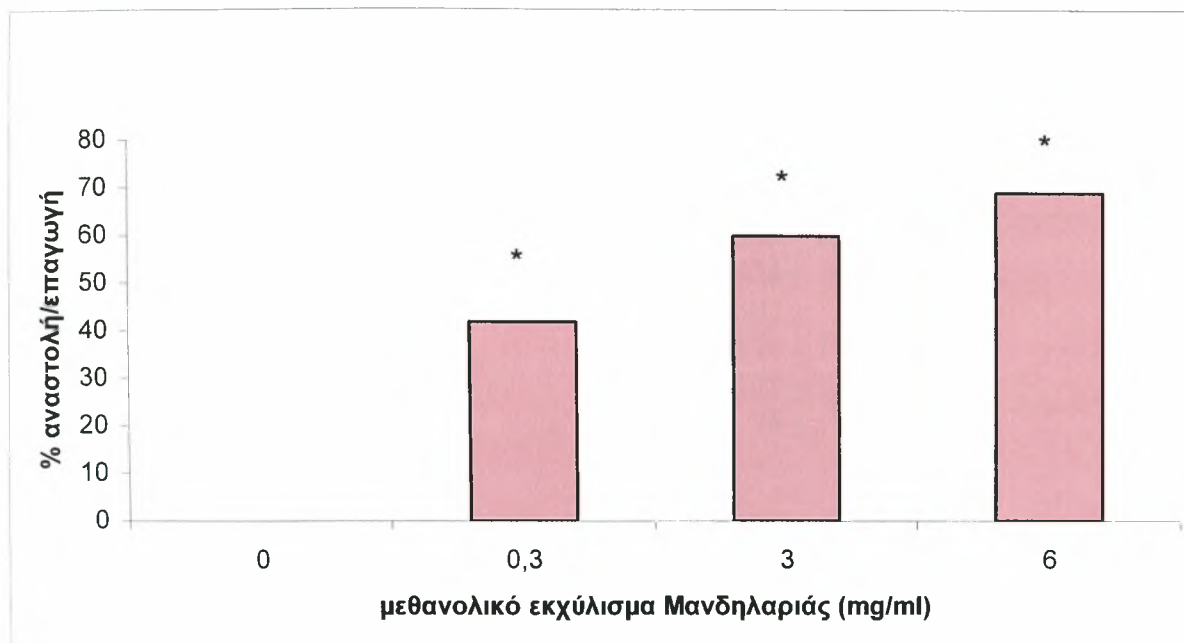
²Η συγκέντρωση της blm ήταν 0,5 μg / τριβλίο.

³Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης.

* Η % αναστολή/επαγωγή είναι στατιστικά σημαντική (p < 0,05).



Σχήμα 3.2.10. Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση της blm ήταν 0,5 μg / τρυβλίο. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους δείχνουν την τυπική απόκλιση. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. *Τιμή στατιστικά σημαντική (p<0,05).

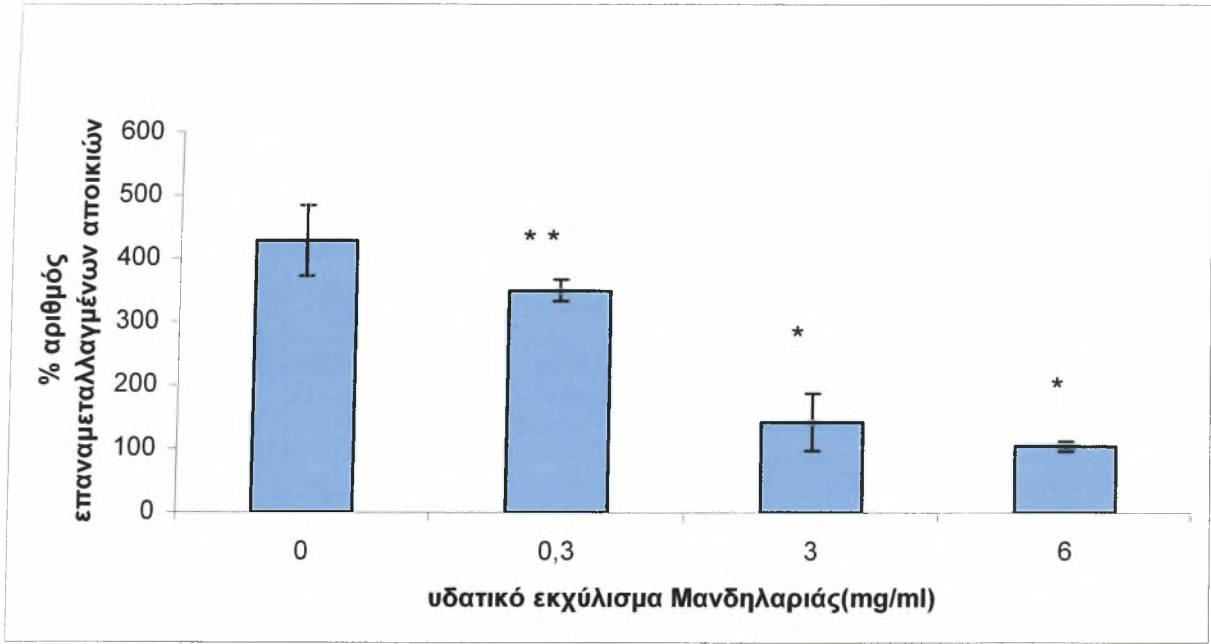


Σχήμα 3.3.10. Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από τη μπερομυκίνη μεταλλαξιογένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιογένεσης.
*Τιμή στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$).

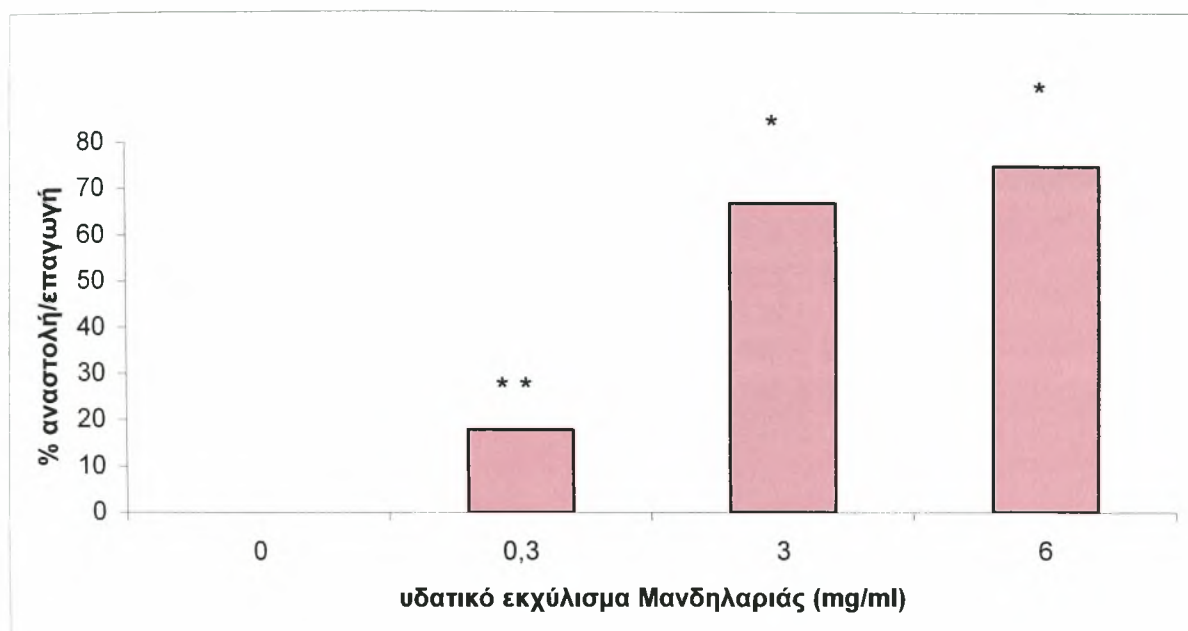
Πίνακας 3.1.11. Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

	αριθμός επαναμεταλλαγμένων αποικιών ¹	% αναστολή/επαγωγή ³ της μεταλλαξιγένεσης
αρνητικός μάρτυρας	390 ± 25	
θετικός μάρτυρας-blm ²	428 ± 56	
3 mg/ml υδατ.εκχ.Μανδηλαριάς	373 ± 2	4 ^{**}
0,15 mg/ml υδατ.εκχ.Μανδ.+blm	179 ± 17	18 [*]
1,5 mg/ml υδατ.εκχ.Μανδ.+blm	122 ± 31	67 [*]
3 mg/ml υδατ.εκχ.Μανδ.+blm	96 ± 4	75 [*]

¹Οι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. Ο μέσος όρος προέκυψε από τις τιμές δύο πειραμάτων στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τρυβλία.
²Η συγκέντρωση της blm ήταν 0,5 μg / τριβλίο.
³Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης.
^{*}Η % αναστολή/επαγωγή είναι στατιστικά σημαντική (p < 0,05).
^{**}Η % αναστολή/επαγωγή δεν είναι στατιστικά σημαντική.



Σχήμα 3.2.11. Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση της blm ήταν 0,5 μg / τρυβλίο. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους δείχνουν την τυπική απόκλιση. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. ^{*}Τιμή στατιστικά σημαντική (p<0,05). ^{**}Τιμή στατιστικά μη σημαντική.



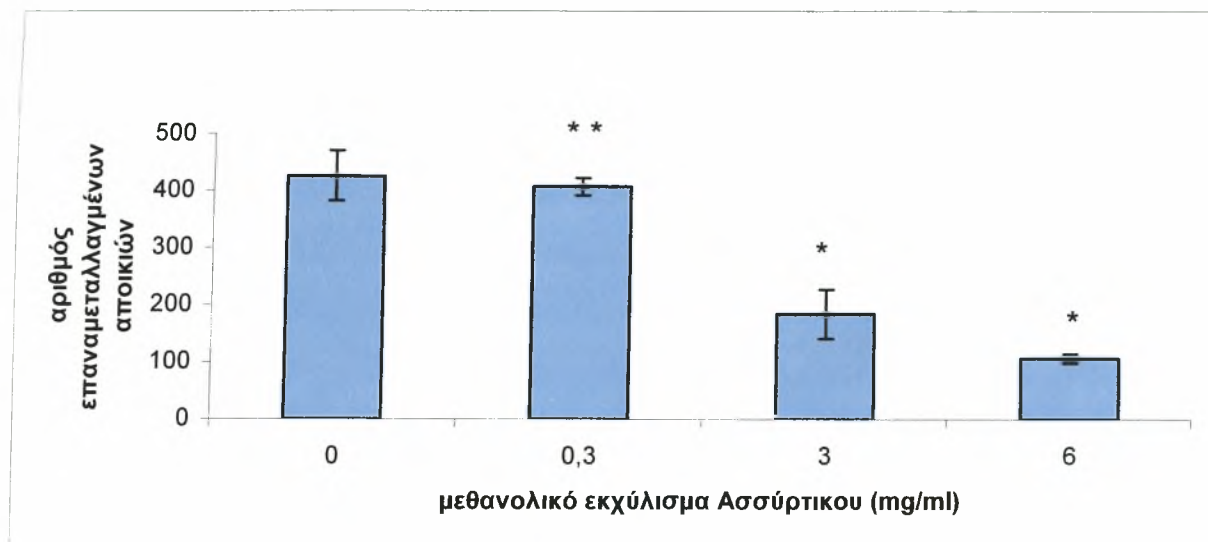
Σχήμα 3.3.11. Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από τη μπεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης.

*Τιμή στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$). **Τιμή στατιστικά μη σημαντική..

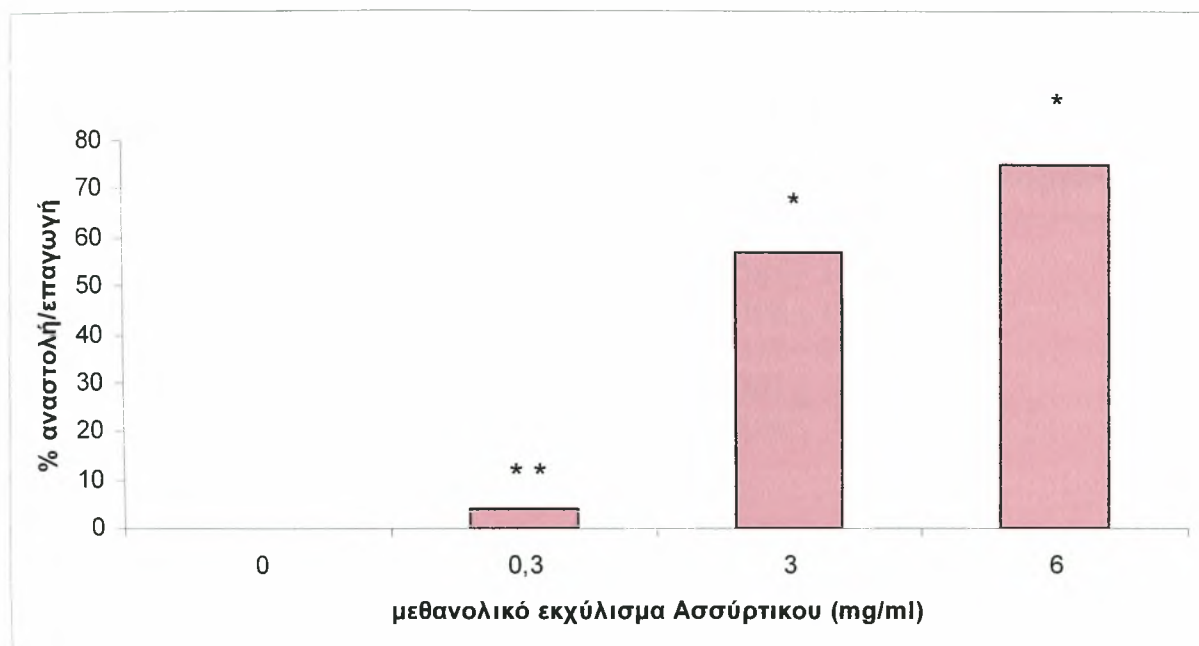
Πίνακας 3.1.12. Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξικένηση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

	αριθμός επαναμεταλλαγμένων αποικιών ¹	% αναστολή/επαγωγή ³ της μεταλλαξικένησης ³
αρνητικός μάρτυρας	339 ± 26	
θετικός μάρτυρας-blm ²	426 ± 44	
3 mg/ml μεθ.εκχ.Ασσύρτικου	320 ± 1	25 ^{*,*}
0,15 mg/ml μεθ.εκχ.Ασσύρτ.+blm	408 ± 15	4 ^{**,}
1,5 mg/ml μεθ.εκχ.Ασσύρτ.+blm	185 ± 43	57 [*]
3 mg/ml μεθ.εκχ.Ασσύρτ.+blm	107 ± 8	75 [*]

¹Οι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. Ο μέσος όρος προέκυψε από τις τιμές δύο πειραμάτων στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τρυβλία.
²Η συγκέντρωση της blm ήταν 0,5 μg / τριβλίο.
³Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξικένησης.
^{*}Η % αναστολή/επαγωγή είναι στατιστικά σημαντική (p < 0,05).
^{**}Η % αναστολή/επαγωγή δεν είναι στατιστικά σημαντική.



Σχήμα 3.2.12. Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσούρτικου στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξικένηση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση της blm ήταν 0,5 μg / τρυβλίο. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους δείχνουν την τυπική απόκλιση. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. ^{*}Τιμή στατιστικά σημαντική (p<0,05). ^{**}Τιμή στατιστικά μη σημαντική.



Σχήμα 3.3.12. Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στην επαγόμενη από τη μπερομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης.

*Τιμή στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$). **Τιμή στατιστικά μη σημαντική.

Πίνακας 3.1.13. Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξικένηση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

	αριθμός επαναμεταλλαγμένων αποικιών ¹	% αναστολή/επαγωγή ³ της μεταλλαξικένησης
αρνητικός μάρτυρας	334 ± 14	
θετικός μάρτυρας-blm ²	241 ± 14	
3 mg/ml υδατ.εκχ.Ασσύρτικου	298 ± 17	-11 [*]
0,15 mg/ml υδατ.εκχ.Ασσύρτ.+blm	212 ± 27	12 ^{**}
1,5 mg/ml υδατ.εκχ.Ασσύρτ.+blm	201 ± 3	17 [*]
3 mg/ml υδατ.εκχ.Ασσύρτ.+blm	156 ± 5	35 [*]

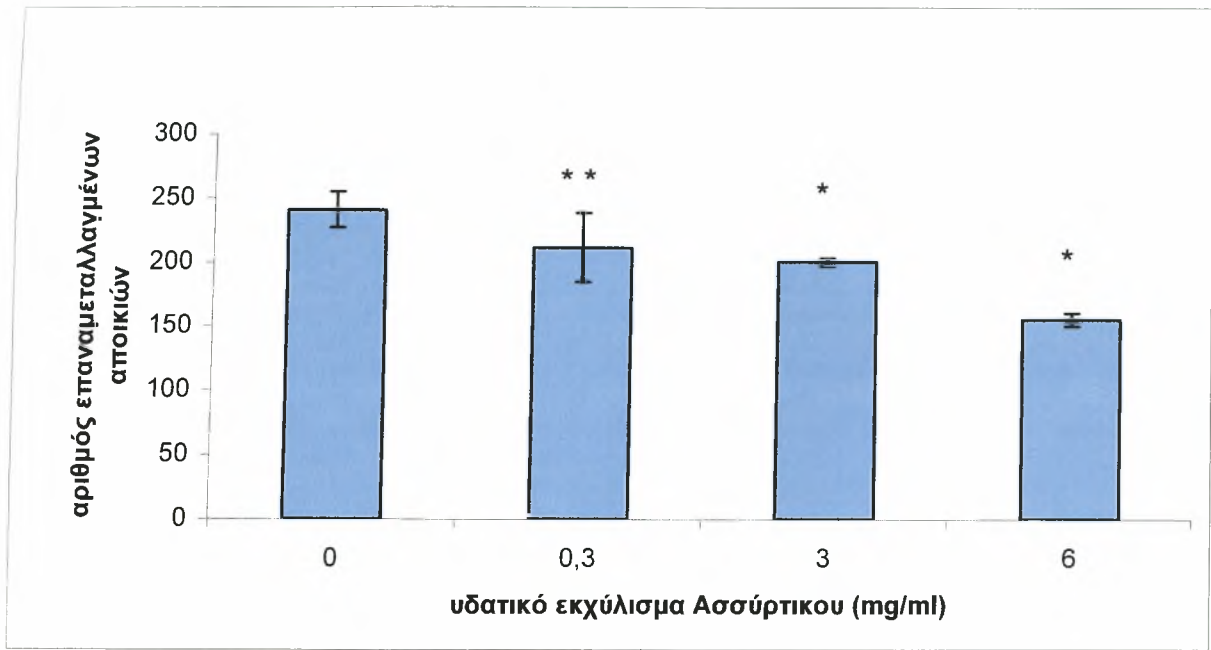
¹Οι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. Ο μέσος όρος προέκυψε από τις τιμές δύο πειραμάτων στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τρυβλία.

²Η συγκέντρωση της blm ήταν 0,5 μg / τριβλίο.

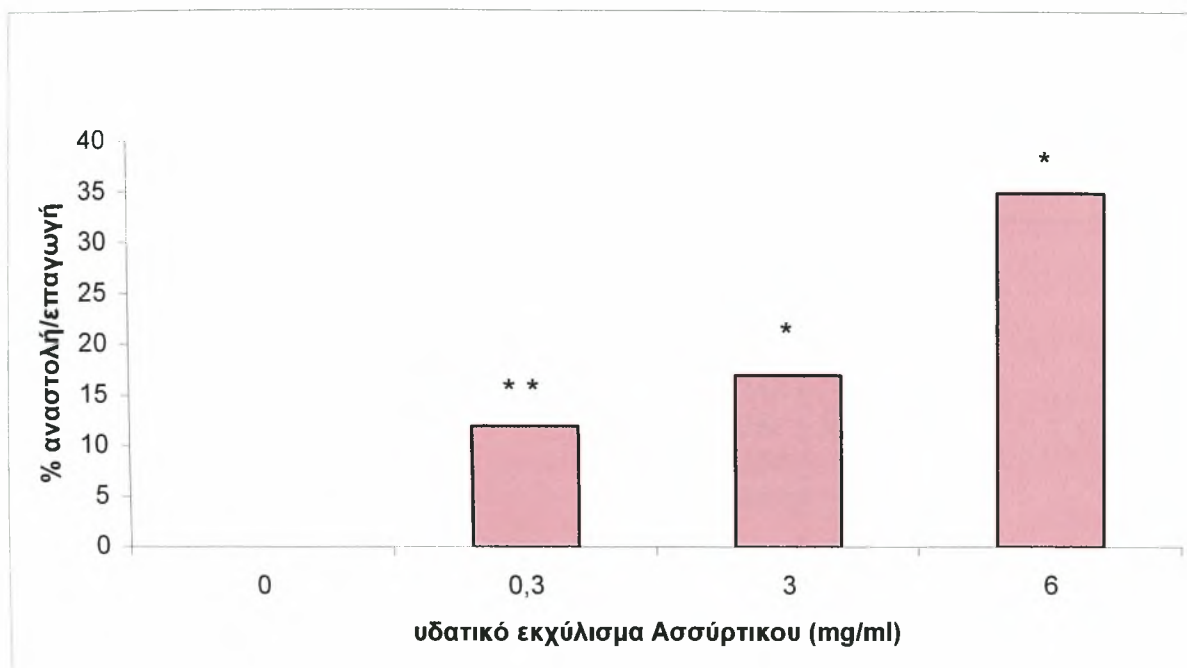
³Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξικένησης.

^{*}Η % αναστολή/επαγωγή είναι στατιστικά σημαντική (p < 0,05).

^{**}Η % αναστολή/επαγωγή δεν είναι στατιστικά σημαντική.



Σχήμα 3.2.13. Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξικένηση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση της blm ήταν 0,5 μg / τρυβλίο. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους δείχνουν την τυπική απόκλιση. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. ^{*}Τιμή στατιστικά σημαντική (p<0,05). ^{**}Τιμή στατιστικά μη σημαντική.



Σχήμα 3.3.13. Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του υδατικού εκχυλίσματος Ασσύρτικου στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης.

*Τιμή στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$). **Τιμή στατιστικά μη σημαντική.

Πίνακας 3.1.14. Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος του μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιογένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

	αριθμός επαναμεταλλαγμένων αποικιών ¹	% αναστολή/επαγωγή της μεταλλαξιογένεσης ³
αρνητικός μάρτυρας	302 ± 10	
θετικός μάρτυρας-blm ²	258 ± 31	
3 mg/ml μεθ.κλ.μεθ.εκχ.Μανδ.	319 ± 25	-24**
0,002 mg/ml μεθ.κλ.μεθ.εκχ.Μανδ.+blm	236 ± 14	9**
0,009 mg/ml μεθ.κλ.μεθ.εκχ.Μανδ.+blm	242 ± 2	6**
0,03 mg/ml μεθ.κλ.μεθ.εκχ.Μανδ.+blm	281 ± 34	-9**
0,3 mg/ml μεθ.κλ.μεθ.εκχ.Μανδ.+blm	254 ± 8	2**
3 mg/ml μεθ.κλ.μεθ.εκχ.Μανδ.+blm	315 ± 7	-22*

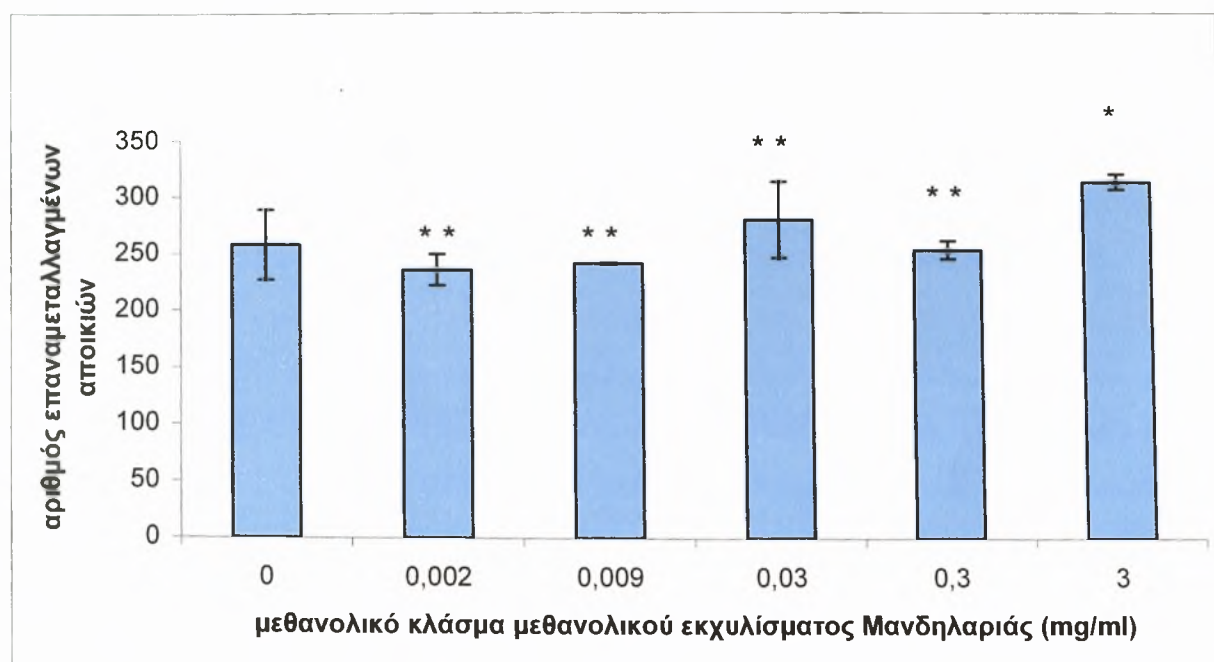
¹Οι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. Ο μέσος όρος προέκυψε από τις τιμές δύο πειραμάτων στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τρυβλία.

²Η συγκέντρωση της blm ήταν 0,5 μg / τρυβλίο.

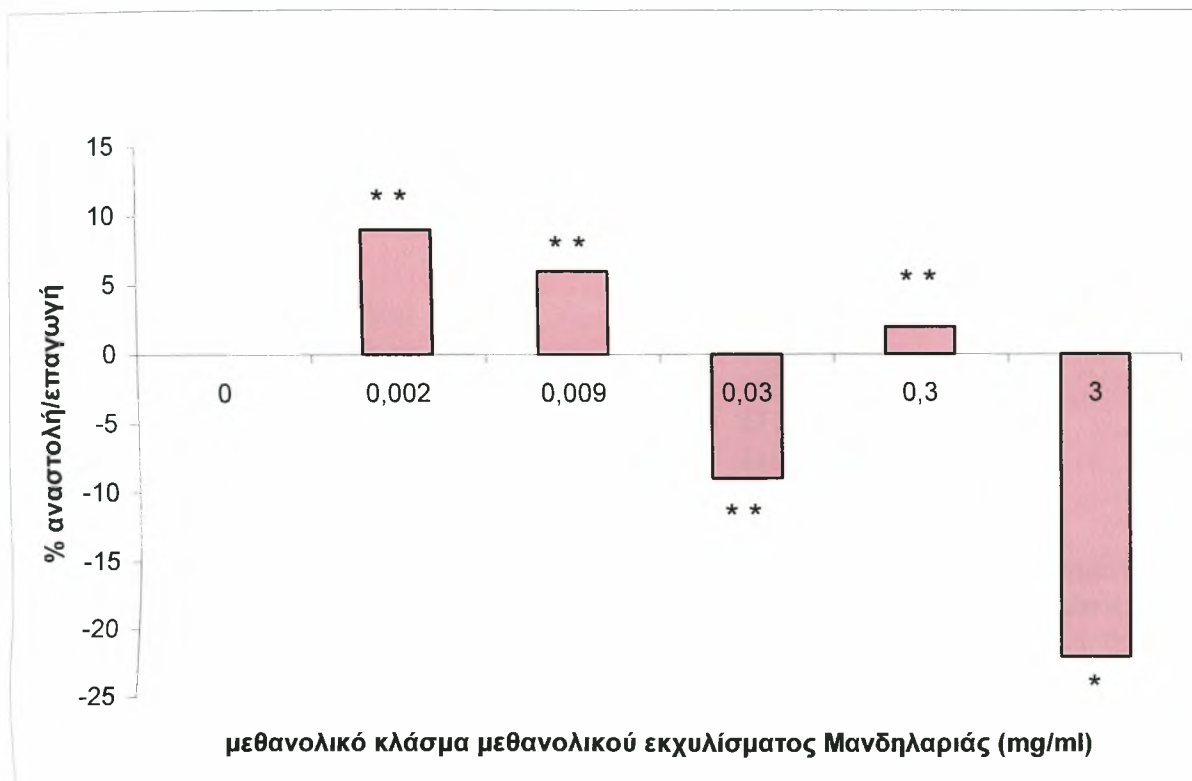
³Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιογένεσης.

* Η % αναστολή/επαγωγή είναι στατιστικά σημαντική (p < 0,05).

** Η % αναστολή/επαγωγή δεν είναι στατιστικά σημαντική.



Σχήμα 3.2.14. Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιογένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση της blm ήταν 0,5 μg / τρυβλίο. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους δείχνουν την τυπική απόκλιση. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. * Τιμή στατιστικά σημαντική (p<0,05). ** Τιμή στατιστικά μη σημαντική.



Σχήμα 3.3.14. Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του μεθανολικού κλάσματος μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από τη μπεομυκίνη μεταλλαζιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαζιγένεσης. *Τιμή στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$). **Τιμή στατιστικά μη σημαντική.

Πίνακας 3.1.15. Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιογένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

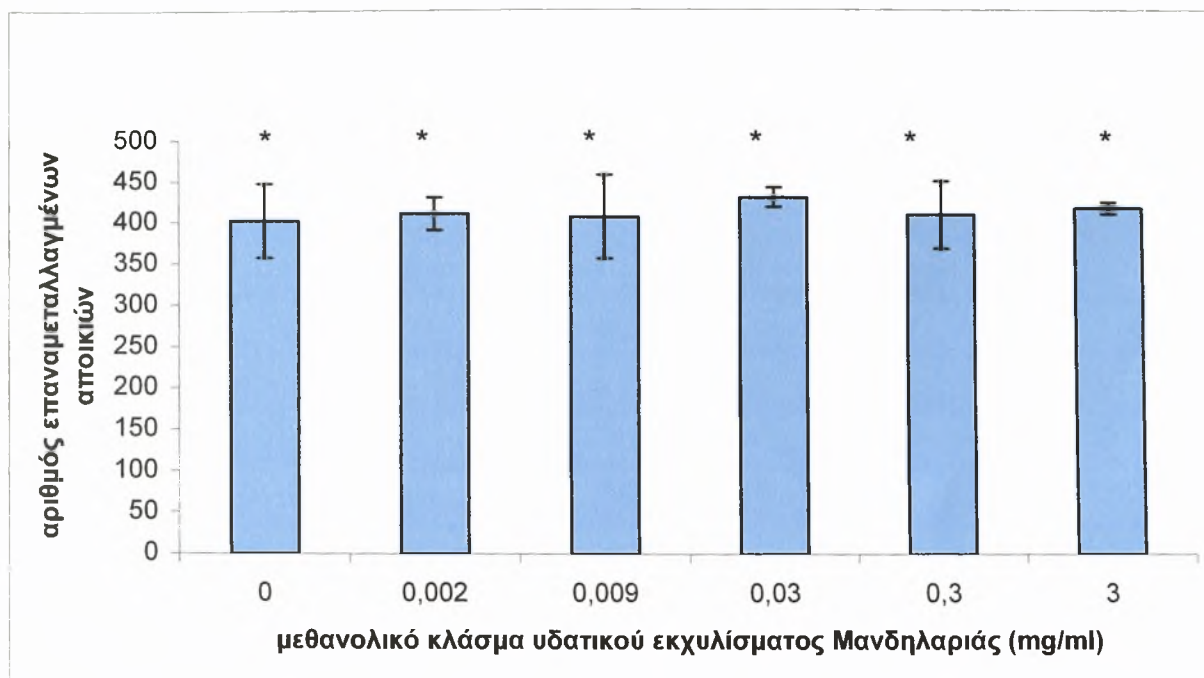
	αριθμός επαναμεταλλαγμένων αποικιών ¹	% αναστολή/επαγωγή της μεταλλαξιογένεσης ³
αρνητικός μάρτυρας	280 ± 16	
θετικός μάρτυρας-blm ²	402 ± 45	
3 mg/ml μεθ.κλ.υδατ.εκχ.Μανδ.	316 ± 20	22*
0,002 mg/ml μεθ.κλ.υδατ.εκχ.Μανδ.+blm	411 ± 20	-2*
0,009 mg/ml μεθ.κλ.υδατ.εκχ.Μανδ.+blm	408 ± 51	-1*
0,03 mg/ml μεθ.κλ.υδατ.εκχ.Μανδ.+blm	432 ± 12	-7*
0,3 mg/ml μεθ.κλ.υδατ.εκχ.Μανδ.+blm	411 ± 41	-2*
3 mg/ml μεθ.κλ.υδατ.εκχ.Μανδ.+blm	419 ± 7	-4*

¹Οι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. Ο μέσος όρος προέκυψε από τις τιμές δύο πειραμάτων στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τριβλία.

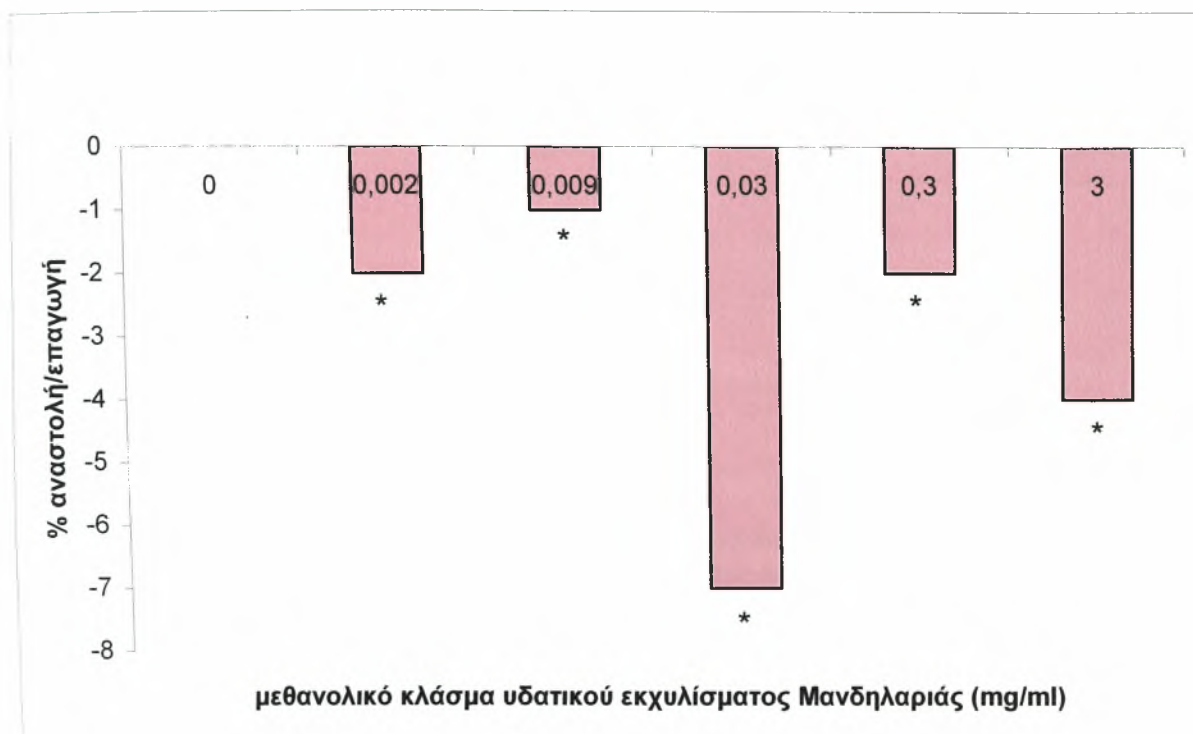
²Η συγκέντρωση της blm ήταν 0,5 μg / τριβλίο.

³Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιογένεσης.

*Η % αναστολή/επαγωγή δεν είναι στατιστικά σημαντική.



Σχήμα 3.2.15. Επίδραση του μεθανολικού κλάσματος υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιογένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση της blm ήταν 0,5 μg / τριβλίο. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους δείχνουν την τυπική απόκλιση. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. *Τιμή στατιστικά μη σημαντική.



Σχήμα 3.3.15. Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του μεθανολικού κλάσματος υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από τη μπερομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιγένεσης. *Τιμή στατιστικά μη σημαντική.

Πίνακας 3.1.16. Επίδραση του EtOAc κλάσματος του υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιογένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

	αριθμός επαναμεταλλαγμένων αποικιών ¹	% αναστολή/επαγωγή της μεταλλαξιογένεσης ³
αρνητικός μάρτυρας	330 ± 14	
θετικός μάρτυρας-blm ²	213 ± 7	
3 mg/ml EtOAc.κλ.υδατ.εκχ.Μανδ.	362 ± 4	-10*
0,002 mg/ml EtOAc.κλ.υδατ.εκχ.Μανδ.+blm	255 ± 21	-4**
0,009 mg/ml EtOAc.κλ.υδατ.εκχ.Μανδ.+blm	251 ± 23	-2**
0,03 mg/ml EtOAc.κλ.υδατ.εκχ.Μανδ.+blm	274 ± 13	-29*
0,3 mg/ml EtOAc.κλ.υδατ.εκχ.Μανδ.+blm	319 ± 23	-50*
3 mg/ml EtOAc.κλ.υδατ.εκχ.Μανδ.+blm	305 ± 19	-43*

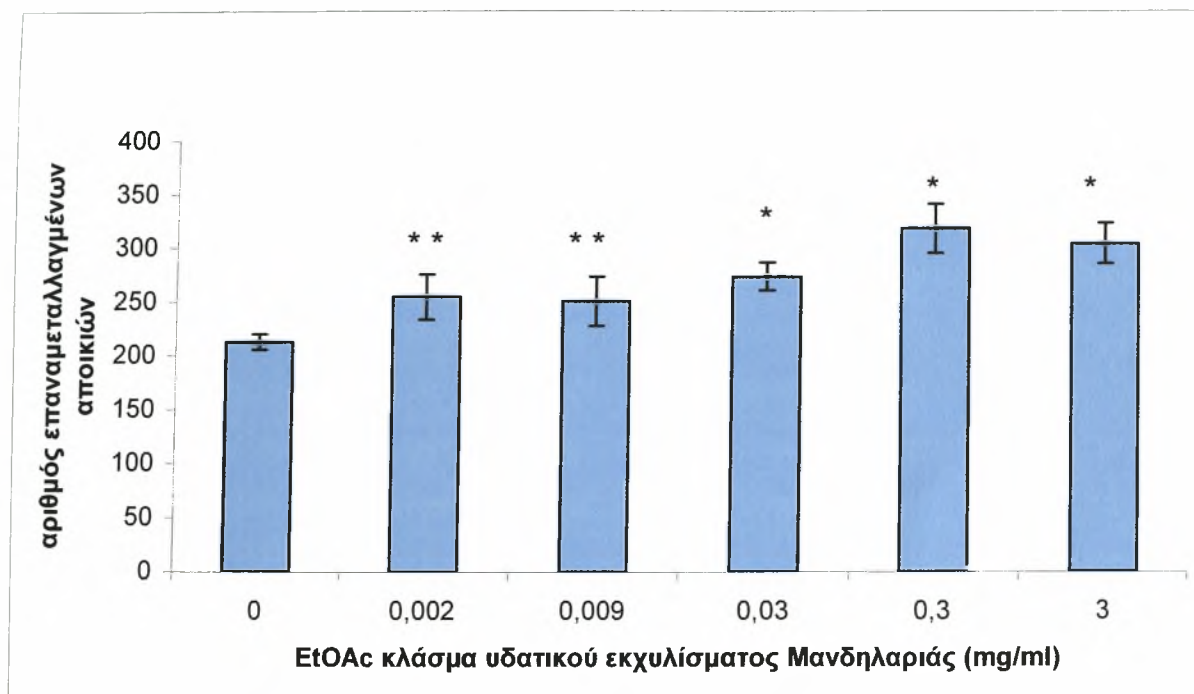
¹ Οι τιμές είναι ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. Ο μέσος όρος προέκυψε από τις τιμές δύο πειραμάτων στα οποία για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν τρία τρυβλία.

² Η συγκέντρωση της blm ήταν 0,5 μg / τρυβλίο.

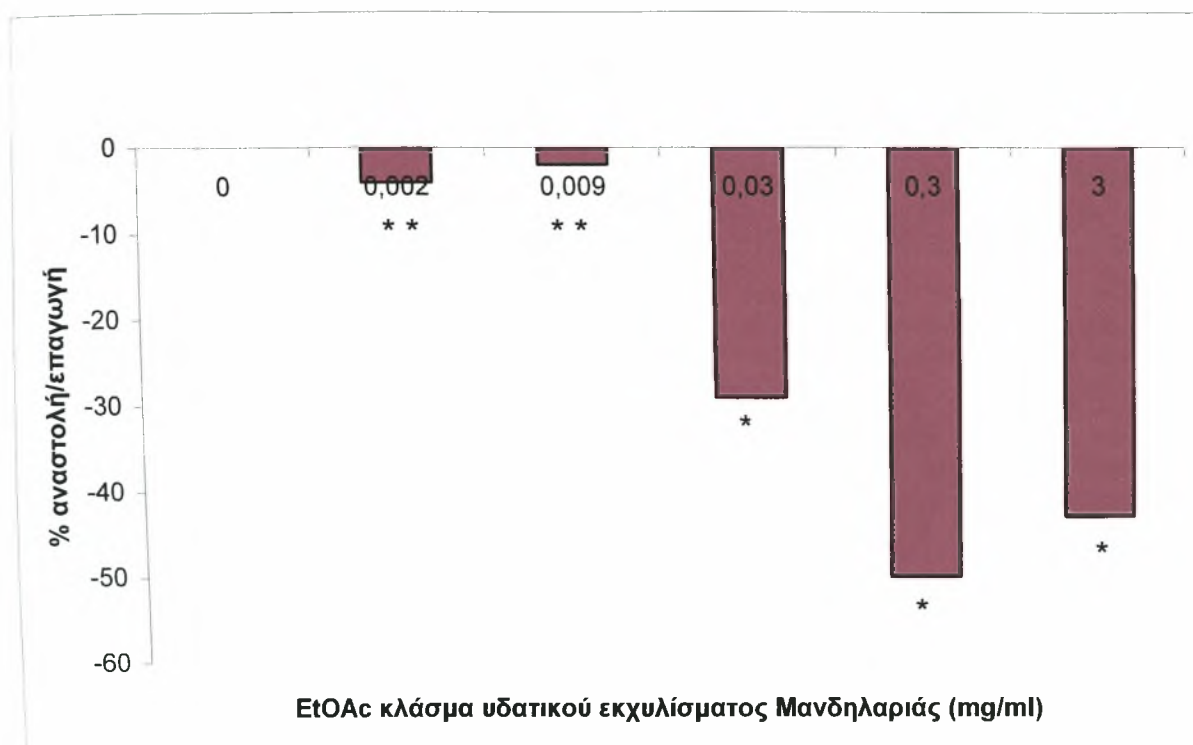
³ Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξιογένεσης.

* Η % αναστολή/επαγωγή είναι στατιστικά σημαντική (p < 0,05).

** Η % αναστολή/επαγωγή δεν είναι στατιστικά σημαντική.



Σχήμα 3.2.16. Επίδραση του EtOAc κλάσματος υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιογένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η συγκέντρωση της blm ήταν 0,5 μg / τρυβλίο. Οι γραμμές σφάλματος στις ράβδους δείχνουν την τυπική απόκλιση. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος του αριθμού των επαναμεταλλαγμένων αποικιών μείον τον αριθμό των αποικιών στις καλλιέργειες-αρνητικοί μάρτυρες. * Τιμή στατιστικά σημαντική (p<0,05). ** Τιμή στατιστικά μη σημαντική.



Σχήμα 3.4.16. Απεικονίζεται η % αναστολή/επαγωγή του EtOAc κλάσματος υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς στην επαγόμενη από τη μπερομυκίνη μεταλλαξικένηση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν επαγωγή της μεταλλαξικένης. *Τιμή στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$). **Τιμή στατιστικά μη σημαντική).

4. Συζήτηση.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της χημειοπροστατευτικής και αντικαρκινογόνου δράσης δύο ελληνικών ποικιλιών αμπέλου (*Vitis vinifera*) καθώς και πολυφαινολών που περιέχονται σε σταφύλια χρησιμοποιώντας το τεστ μεταλλαξιγένεσης του Ames. Για το σκοπό αυτό εξετάστηκε η επίδραση, των εκχυλισμάτων των ποικιλιών *Ασύρτικο Σαντορίνης* (άσπρα σταφύλια) και *Μανδηλαριά Σαντορίνης* (κόκκινα σταφύλια), των κλασμάτων της ποικιλίας *Μανδηλαριά Σαντορίνης* και πέντε πολυφαινολών που συναντώνται σε αφθονία στα σταφύλια, στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.

Το ενδιαφέρον για τη μελέτη της δράσης συγκεκριμένων πολυφαινολών του κρασιού διαρκώς αυξάνει, λόγω της συνεχούς ανακάλυψης ποικίλων πιθανών οφελών τους στην ανθρώπινη υγεία. Οι μελέτες που περιγράφουν τις πιθανές αντικαρκινικές ιδιότητες των πολυφαινολών του κόκκινου κρασιού καλύπτουν ένα μεγάλο ποσοστό της βιβλιογραφίας (George J. Soleas et al., 2002). Οι πολυφαινόλες μπορούν να παρεμβαίνουν σε αρκετά από τα στάδια που οδηγούν στην ανάπτυξη των κακοήθων όγκων, παρουσιάζοντας αντικαρκινογόνες και αντιμεταλλαξιγόνες επιδράσεις (Ines Urquiaga and Federico Leighton, 2000). Πρόσφατες μελέτες έχουν επιδείξει ότι εκχυλίσματα σταφυλιών ανέστειλαν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων του μαστού, του πνεύμονα και του εντέρου (Ye X. Krohn et al., 199938). Επιπλέον, εκχυλίσματα από σταφύλια παρουσίασαν αντικαρκινογόνο δράση σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν *in vivo* σε ποντίκια (Zhao J. et al., 199939). Οι χημειοπροστατευτικές και αντικαρκινογόνες επιδράσεις των εκχυλισμάτων έχουν αποδοθεί σε διαφορετικούς βιοχημικούς μηχανισμούς όπως είναι διακοπή του κυτταρικού κύκλου μέσω τροποποίησης των μονοπατιών μεταβίβασης σήματος (Agarwal C et al., 200040), η αναστολή ενζύμων, όπως η τοποϊσομεράση I, που εμπλέκονται σε κρίσιμες κυτταρικές διαδικασίες (Stagos et al., υπο δημοσίευση). Μέσω αυτής της μελέτης επιδιώχθηκε να διαπιστωθεί εάν η αναστολή των μεταλλάξεων στο DNA αποτελεί έναν επιπλέον μηχανισμό με τον οποίο τα εκχυλίσματα σταφυλιών ασκούν την αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους.

Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι εκχυλίσματα σταφυλιών αναστέλλουν την επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η μπλεομυκίνη είναι ένα αντιβιοτικό με αντικαρκινογόνο δράση, το οποίο δεσμεύεται στο DNA προκαλώντας μονόκλωνα και κάποια δίκλωνα σπασίματα (B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge – Free Radicals in Biology and Medicine, 1989). Η αντικαρκινογόνος δράσης της μπλεομυκίνης συνδέεται με τη δυνατότητά της να διακόπτει την κυτταρική διαίρεση, λόγω των προαναφερόμενων βλαβών που προκαλεί στην έλικα του DNA (Paweł Jałoszy et al., 1997). Επίσης, είναι πολύ ισχυρός δεσμευτής των ιόντων των μεταβατικών μετάλλων, όπως είναι τα Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , αλλά *in vivo*, μόνο ο σίδηρος και πιθανώς και ο χαλκός, φαίνεται να διαμεσολαβούν στην επαγόμενη από την μπλεομυκίνη βλάβη του DNA (B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge – Free Radicals in Biology and Medicine, 1989).

Οι πολυφαινόλες είναι αποτελεσματικοί ανασταλτικοί παράγοντες της προκαλούμενης από μέταλλα οξειδωσης, δεσμεύοντας ιόντα μετάλλων και αναστέλλοντας μέσω αυτής της δράσης την προκαλούμενη από τις ελεύθερες ρίζες βλάβη (K.E. Heim et al., 2002). Γενικά, θεωρείται ότι η δυνατότητα των πολυφαινολών να σχηματίζουν χηλικές ενώσεις με το Fe^{2+} είναι πολύ σημαντική για την αντιοξειδωτική δραστηριότητά τους (Saskia A. B. E. van Acker et al., 1998). Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι το μεθανολικό εκχύλισμα *Μανδηλαριάς* σε συγκεντρώσεις 0,3, 3 και 6 mg ανά τριβλίο αναστέλλει τη δράση της μπλεομυκίνης κατά 42%, 60% και 69% αντίστοιχα ($p<0,05$), το υδατικό εκχύλισμα *Μανδηλαριάς* σε συγκεντρώσεις 3 και 6 mg ανά τριβλίο αναστέλλει κατά 67% και 75% αντίστοιχα ($p<0,05$), το μεθανολικό εκχύλισμα *Ασύρτικου* σε συγκεντρώσεις 3 και 6 mg ανά τριβλίο αναστέλλει κατά 57% και 75% αντίστοιχα ($p<0,05$) και το υδατικό εκχύλισμα *Ασύρτικου* σε συγκεντρώσεις 3 και 6 mg ανά τριβλίο αναστέλλει κατά 17% και 35% αντίστοιχα ($p<0,05$). Η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των

εκχυλισμάτων των σταφυλίων ίσως να οφείλεται στις χηλικές ιδιότητες των πολυφαινόλων που περιέχουν, δηλαδή στην ικανότητά τους να δεσμεύουν μεταβατικά μέταλλα όπως ο Fe^{+2} (όπως αναφέρθηκε παραπάνω η μεταλλαξιγόνος δράση της μπλεομυκίνης απαιτεί παρουσία Fe^{+2}). Συνεπώς, τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στην υπόθεση ότι η ιδιότητά των πολυφαινόλων να δεσμεύουν μέταλλα και να προστατεύουν το DNA από μεταλλάξεις που προκαλούνται μέσω ελεύθερων ριζών, ίσως να αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς στους οποίους οφείλεται η χημειοπροστατευτική δράση που επιδεικνύουν τα εκχυλίσματα των σταφυλίων. Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με τα συμπεράσματα πρόσφατης μελέτης στην οποία είχε χρησιμοποιηθεί μιτομυκίνη C, που προκαλούσε μέσω της οξειδωτικής της δράσης μεταλλάξεις σε πλασμιδιακό DNA. Τα εκχυλίσματα από σταφύλια, ίδιων ποικιλιών αμπέλου με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, έδειξαν ότι αναστέλλουν τη δράση της μιτομυκίνης (Stagos et al., υπο δημοσίευση).

Επίσης, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση κλασμάτων εμπλουτισμένων σε πολυφαινόλες της ποικιλίας Μανδηλαριάς, στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιογένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Σε αντίθεση με τα εκχυλίσματα, τα κλάσματα παρουσίασαν προ-οξειδωτική δράση. Συγκεκριμένα, το μεθανολικό κλάσμα μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς σε συγκέντρωση 3 mg ανά τριβλίο προκαλεί επαγωγή της δράσης της μπλεομυκίνης κατά 22% ($p < 0,05$) και το κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα υδατικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς σε συγκεντρώσεις 0,03, 0,3 και 3 mg ανά τριβλίο προκαλεί επαγωγή κατά 29%, 50% και 43% αντίστοιχα ($p < 0,05$). Το υδατικό κλάσμα μεθανολικού εκχυλίσματος Μανδηλαριάς βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει σημαντικά την επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιογένεση. Συγκρίνοντας τα προαναφερόμενα κλάσματα, το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα επάγει σε μεγαλύτερο ποσοστό της δράση της μπλεομυκίνης και εμφανίζει επαγωγική δράση ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις της τάξης των 0,03 mg ανά τριβλίο, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στο μεγαλύτερο ποσοστό πολυφαινόλων που περιέχει σε σχέση με τα άλλα δύο κλάσματα που εξετάστηκαν.

Επίσης, εξετάστηκαν πέντε πολυφαινόλες που περιέχονται στα σταφύλια (κατεχίνη, επικατεχίνη, κερκετίνη, ρεσβερατρόλη και ελλαγικό οξύ), ως προς την επίδραση που παρουσιάζουν στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιογένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Η κερκετίνη σε συγκέντρωση 100 μM βρέθηκε ότι επάγει τη δράση της μπλεομυκίνης κατά 19% ($p < 0,05$), και η ρεσβερατρόλη σε συγκεντρώσεις 100 και 500 μM βρέθηκε ότι επάγει τη δράση της μπλεομυκίνης κατά 18% και 47% αντίστοιχα ($p < 0,05$). Η κατεχίνη, η επικατεχίνη και το ελλαγικό οξύ βρέθηκε ότι δεν επηρεάζουν σημαντικά την επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιογένεση. Επομένως, η κερκετίνη και η ρεσβερατρόλη παρουσίασαν προοξειδωτική δράση.

Η προοξειδωτική δράση που παρουσίασαν τα κλάσματα και οι καθαρές πολυφαινόλες, πιθανώς να οφείλεται στην ιδιότητα κάποιων φαινολικών αντιοξειδωτικών να ανάγουν τον τρισθενή σίδηρο σε δισθενή (B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge – Free Radicals in Biology and Medicine, 1989), γεγονός που οδηγεί σε αυξημένα διαθέσιμα ποσά δισθενή σιδήρου και σε αυξημένη μεταλλαξιγόνο δράση της μπλεομυκίνης (ο δισθενής σίδηρος είναι απαραίτητος για τη δράση της μπλεομυκίνης). Όπως προαναφέρθηκε, οι πολυφαινόλες δημιουργούν χηλικές ενώσεις με τον σίδηρο, όταν όμως το σύμπλοκο πολυφαινόλης-σιδήρου είναι οξειδοαναγωγικά ασταθές τότε διευκολύνεται η διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου που πραγματοποιείται μέσω της αντίδρασης Fenton, και παράγονται ενεργές ρίζες οξυγόνου που προκαλούν βλάβες στο DNA (Tom Chan et al., 1998). Επιπροσθέτως, έχει αναφερθεί ότι μερικές πολυφαινόλες που ανιχνεύονται στα σταφύλια, όπως οι κατεχίνες, προκαλούν σπασίματα στους κλώνους του DNA παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων (Hayakawa F. et al., 1999), (Masataka Yoshino et al., 1999). Η προαναφερόμενη προ-οξειδωτική δράση, μπορεί να αποτελέσει πιθανή εξήγηση της δράσης των πολυφαινόλων ως αντικαρκινιγόνα, διότι μέσω αυτής μπορούν να προκαλέσουν διακοπή της κυτταρικής ανάπτυξης και επαγωγή της απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα. Από την

άλλη μεριά, υποστηρίζεται ότι η προ-οξειδωτική δράση που προκύπτει μέσω της αυτό-οξειδωσης των πολυφαινολών από μεταβατικά μέταλλα μπορεί να μην είναι σημαντική *in vivo* (Tom Chan et al., 1998), γιατί τα μέταλλα μετάβασης που βρίσκονται *in vivo* και στο πλάσμα σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες και είναι απίθανο να καταλύουν την αυτό-οξειδωση των πολυφαινολών σε σημαντικό βαθμό (Giuseppe Galati et al., 2002).

Από τα αποτελέσματα του πειράματος προκύπτει μια αντίφαση ανάμεσα στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων και στην προοξειδωτική δράση των κλασμάτων και καθαρών πολυφαινολών, διότι και οι δύο αντίθετες δράσεις αποδίδονται σε πολυφαινολικά συστατικά. Το οξύμωρο των υποθέσεων μπορεί να εξαλειφθεί λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι τα εκχυλίσματα δεν έχουν την ίδια σύσταση και αναλογία σε πολυφαινόλες με τα κλάσματα (τα κλάσματα έχουν μεγαλύτερο ποσοστό πολυφαινολών), καθώς και το ότι οι πολυφαινόλες στα εκχυλίσματα μπορεί να αλληλεπιδρούν με άλλα συστατικά που περιέχονται στα σταφυλία.

Μελλοντικοί στόχοι.

Στη μελέτη αυτή εξετάστηκε η επίδραση εκχυλισμάτων και κλασμάτων ελληνικών ποικιλιών αμπέλου καθώς και καθαρών πολυφαινολών στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε προκαρυωτικά κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν τόσο *in vivo* σε πειραματόζωα όσο και *in vitro* σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, με σκοπό να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός δράσης των πολυφαινολών των σταφυλίων με τον οποίο επιδρούν στην επαγόμενη από οξειδωτικά, όπως η μπλεομυκίνη, μεταλλαξιγένεση. Για παράδειγμα, θα μπορούσε να διεξαχθεί ένα πείραμα όπου θα χορηγούνταν σε μια ομάδα ποντικών εκχυλίσματα μαζί με μπλεομυκίνη και σε μια άλλη ομάδα ποντικών μόνο μπλεομυκίνη. Κατόπιν, μέσω κυτταρογενετικών μελετών, όπως αυτής των χρωματιδιακών ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων (sister chromatid exchange), μπορεί να εξεταστεί *in vivo* η επίδραση των εκχυλισμάτων στην επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες μεταλλαξιγένεση. Επίσης, ένα ακόμη παράδειγμα μελέτης των μηχανισμών δράσης των εκχυλισμάτων είναι η *in vitro* μελέτη τους μετά από χορήγηση τους μαζί με μπλεομυκίνη σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων. Και σε αυτή την περίπτωση οι καλλιέργειες στις οποίες έχει προστεθεί μόνο μπλεομυκίνη, θα αποτελούν τους μάρτυρες-control του πειράματος. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι αυτή η κυτταρογενετική μελέτη αποτελεί μια εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδο ανίχνευσης βλαβών στο DNA επαγόμενων άμεσα ή έμμεσα από ουσίες σε χαμηλή συγκέντρωση, συμβάλλοντας στην εκτίμηση των βιολογικών φαινομένων της μεταλλαξιγένεσης και της καρκινογένεσης. Επιπλέον, θα μπορούσαν να διεξαχθούν μελέτες με σκοπό να διευκρινιστούν τα βιολογικά δραστικά συστατικά των σταφυλίων, καθώς και οι μηχανισμοί απορρόφησης και βιο-διαθεσιμότητάς τους. Τα αποτελέσματα τέτοιων μελετών είναι απαραίτητα προκειμένου να γίνει δυνατή η μελλοντική χρήση των πολυφαινολών των σταφυλίων ως αντικαρκινογόνα.

Συμπέρασμα.

Τα εκχυλίσματα ελληνικών ποικιλιών αμπέλου παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση, πιθανώς μέσω της δέσμευσης σιδήρου, στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102, ενώ τα κλάσματα των ποικιλιών και οι καθαρές πολυφαινόλες κερκετίνη και ρεσβερατρόλη παρουσίασαν προοξειδωτική δράση στην επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη μεταλλαξιγένεση σε κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102. Αυτή η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων θα μπορούσε να είναι ένας ακόμη μηχανισμός με τον οποίο τα εκχυλίσματα σταφυλιών ασκούν τις χημειοπροστατευτικές ιδιότητές τους. Επίσης, η προοξειδωτική δράση των εμπλουτισμένων σε πολυφαινόλες κλασμάτων και των καθαρών πολυφαινολών θα μπορούσε να αποδειχθεί ωφέλιμη στη θεραπεία του καρκίνου. Είναι προφανής ο διττός ρόλος των εκχυλισμάτων των σταφυλιών, τόσο ως χημειοπροστατευτικά όσο και ως αντικαρκινογόνα, και αναμένεται περαιτέρω έρευνα για την επαλήθευση και επέκταση των συμπερασμάτων που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη.

5. Βιβλιογραφία.

Alexander C Whitley, Gary D. Stoner, Michael V. Darby and Thomas Walle: Intestinal epithelial cell accumulation of the cancer preventive polyphenol ellagic acid-extensive binding to protein and DNA. *Biochemical Pharmacology* 66 (6): 907-915, 2003.

Agarwal C., Sharma Y., Zhao J. and Agarwal R.: A polyphenolic fraction from grape seeds causes irreversible growth inhibition of breast carcinoma MDA-MB468 cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase activation and inducing G1 arrest and differentiation. *Clin. Cancer Res.* 6: 2921-2930, 2000.

Andrea J. Day, Yongping Bao, Michael R. A. Morgan and Gary Williamson: Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radical Biology and Medicine* 29 (12): 1234-1243, 2000.

Andreas R. Rechner, Gunter Kuhnle, Paul Bremner, Gary P. Hubbard, Kevin P. Moore and Catherine A. Rice-Evans: The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biology and Medicine* 33(2): 220-235, 2002.

Anne S. Meyer, Marina Heinonen and Edwin N. Frankel: Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry* 61: 71-75, 1998.

Anne S. Meyer, Ock-Sook Yi, Debra A. Pearson, Andrew L. Waterhouse and Edwin N. Frankel: Inhibition of Human Low-Density Lipoprotein Oxidation in Relation to Composition of Phenolic Antioxidants in Grapes (*Vitis vinifera*). *Agric. Food Chem.* 45 (5): 1638 -1643, 1997.

A. Constantinou, G.D. Stoner, R. Mehta, K. Rao, C. Runyan and R. Moon: The dietary anticancer agent ellagic acid is a potent inhibitor of DNA topoisomerases in vitro. *Nutr. Cancer* 23: 121-130, 1995.

A. van de Wiel, P. H. M. van Golde and H. Ch. Hart: Blessings of the grape. *European Journal of Internal Medicine* 12: 484-489, 2001.

B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge – *Free Radicals in Biology and Medicine*, 1989.

Catherine A. Rice-Evans, Nicholas J. Miller, and George Paganga: Structure-Antioxidant Activity Relationships Of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radical Biology & Medicine* 20 (7): 933-956, 1996.

Cook and S. Samman: Flavonoids-Chemistry,metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* 7: 66-76, 1996.

Cyril Auger, Najim Al-Awwadi, Aurélie Bornet, Jean-Max Rouanet, Francis Gasc, Gerard Cros and Pierre-Louis Teissedre : Catechins and procyanidins in Mediterranean diets. *Food Research International* 37 (3): 233-245, 2004.

D. E. Levin, M. Hollstein, M. F. Christman, E. A. Schwiers, and B. N. Ames: A new Salmonella tester strain (TA102) with A X T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 79 (23): 7445–7449, 1982.

D. Stagos, G. Kazantzoglou, P. Magiatis, S. Mitaku, C. Anagnostopoulos and D. Kouretas: Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* on Mytomycin C and topoisomerase I nicking of DNA: (υπό δημοσίευση).

George J. Soleas, Linda Grass, P. David Josephy, David M. Goldberg and Eleftherios P. Diamandis: A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clinical Biochemistry* 35 (2): 119-124, 2002.

Giuseppe Galati, Omid Sabzevari, John X. Wilson and Peter J. O'Brien: Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* 177: 91-104, 2002.

G. Williamson, A. J. Day, G. W. Plumb and D. Couteau: Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochemical Society Transactions* 28 (2), 2000.

Hari L. Ratan, Will P. Steward, Andreas J. Gescher and J. Kilian Mellon: Resveratrol - A prostate cancer chemopreventive agent? *Urologic Oncology* 7 (6): 223-227, 2002.

Hayakawa F. Kimura, T. Hoshimo and Ando T.: DNA cleavage activities of (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin, (+)-catechin and (-)-epigallocatechin gallate with various kind of metal ions. *Biosc. Biotech. Bioch.* 63: 1654-1656, 1999.

H. Tapiero, K. D. Tew, G. Nguyen Ba and G. Mathé: Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedecine & Pharmacotherapy* 56 (4): 200-207, 2002.

I. Budic-Leto and T. Lovric: Phenolic Acids and their Content in White Wines. *Food Technol. Biotechnol.* 40 (3): 221-225, 2002.

Idolo Tedesco, Maria Russo, Paola Russo, Giuseppe Iacomino, Gian Luigi Russo, Antonio Carraturo, Clementina Faruolo, Luigi Moio and Rosanna Palumbo: Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 11 (2): 114-119, 2000.

Ines Urquiaga and Federico Leighton: Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biological Research* 33 (2), Santiago 2000.

Jungil Hong, Theresa J. Smith, Chi-Tang Ho, David A. August and Chung S. Yang. Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues. *Biochemical Pharmacology* 62 (9): 1175-1183, 2001.

Kelly E. Heim, Anthony R. Tagliaferro and Dennis J. Bobilya: Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13 (10): 572-584, 2002.

Kristien Mortelmans and Errol Zeiger: The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 455: 29-60, 2000.

Li-Man Hung, Jan-Kan Chen, Shiang-Suo Huang, Ren-Shen Lee and Ming-Jai Su: Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovascular Research* 47 (3): 549-555, 2000.

Lynnette R. Ferguson: Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 475 (1-2): 89-111, 2001.

Manal M. Abd El Mohsen, Gunter Kuhnle, Andreas R. Rechner, Hagen Schroeter, Sarah Rose, Peter Jenner and Catherine A. Rice-Evans: Uptake and Metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radical Biology and Medicine* 33 (12): 1693-1702, 2002.

Mark Percival: Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights* 031: 1/96 Rev. 10/98N.C.

Masataka Yoshino, Miyako Haneda, Makoto Naruse and Keiko Murakami: Prooxidant Activity of Flavonoids: Copper-Dependent Strand Breaks and the Formation of 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine in DNA. *Molecular Genetics and Metabolism* 68: 468-472, 1999.

Mingfu Wang, Yi Jin, and Chi-Tang Ho: Evaluation of Resveratrol Derivatives as Potential Antioxidants and Identification of a Reaction Product of Resveratrol and 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3974-3977, 1999.

Mylonas C. and Kouretas D.: Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*. 13 (3): 295-309, 1999.

Paul Cos, Li Ying, Mario Calomme, Jia P. Hu, Kanyanga Cimanga, Bart Van Poel, Luc Pieters, Arnold J. Vlietinck, and Dirk Vanden Berghe: Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. *J. Nat. Prod.* 61 (1): 71 -76, 1998.

Pawel Jalszyski, Maciej Kujawski, Maria Czub-wierczek, Janina Markowska and Krzysztof Szyfter: Bleomycin induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer studied patients by comet assay. *Mutation Research/DNA Repair* 385 (3): 223-233, 1997.

Peter C. H. Hollman, John M. P. van Trijp, Michel N. C. P. Buysman, Martijn S. v.d. Gaag, Marcel J. B. Mengelers, Jeanne H. M. de Vries and Martijn B. Katan: Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters* 418 (1-2): 152-156, 1997.

Peter W. Thulstrup, Thorsten Thormann, Jens Spanget-Larsen and Hanne Cathrine Bisgaard: Interaction between Ellagic Acid and Calf Thymus DNA Studied with Flow Linear Dichroism Spectroscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 265: 416-421, 1999.

Pierre-Louis Teissedre and Nicolas Landrault: Wine phenolics: contribution to dietary intake and bioavailability. *Food Research International* 33: 461-467, 2000.

Robert J Nijveldt, Els van Nood, Danny EC van Hoorn, Petra G Boelens, Klaske van Norren and Paul AM van Leeuwen: Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* 74 (4): 418-425, 2001.

Rüdiger Wippel , Margit Rehn , Antonius C. F. Gorren , Kurt Schmidt and Bernd Mayer: Interference of the polyphenol epicatechin with the biological chemistry of nitric oxide- and peroxynitrite-mediated reactions. *Biochemical Pharmacology* 67 (7): 1285-1295, 2004.

Saskia A. B. E. van Acker, Georgette Plemper van Balen, Dirk-Jan van den Berg, Aalt Bast and Wim J. F. van der Vijgh: Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochemical Pharmacology* 56: 935-943, 1998.

Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM: Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal.* 11(5): 287-313, 1997.

Stagos D., Kouris S. and Kouretas D.: Plant phenolics protect from bleomycin-induced oxidative stress and mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA102. *Anticancer Res.* 24 (2B):743-5, 2004.

Svend J. Knak Jensen: Oxidative stress and free radicals. *Journal of Molecular Structure* 66-667: 387-392, 2003.

S. Uddin and M.A. Choudhry: Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the DNA synthesis of human leukemia cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 36 (3): 545-550, 1995.

Tammy M. Bray PhD: Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress. *Nutrition*: 16 (7-8): 578-581, 2000.

Tom Chan, Giuseppe Galati, Peter J. O'Brien: Oxygen activation during peroxidase catalysed metabolism of flavones or flavanones. *Chemico-Biological Interactions* 122: 15-25, 1999.

T. Ohta: Modification of genotoxicity by naturally occurring flavorings and their derivatives. *Crit. Rev. Toxicol.* 23: 127-146, 1993.

V. Abalea, J. Cillard, M.P. Dubos, O. Sargent, P. Cillard and I. Morel: Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures. *Free Rad. Biol. Med.* 26: 1457-1466, 1999.

V. Filip, M. Plocková, J. Smidrkal, Z. Spicková, K. Melzoch and S. Schmidt: Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. *Food Chemistry* 83 (4): 585-593, 2003.

V. Valls-Bellés, P. Muñoz, P. González, M. L. González-Sanjosé and S. Beltran: Mechanism of protection by epicatechin against tert-butylhydroperoxide induced oxidative cell injury in isolated rat hepatocytes and calf thymus DNA. *Process Biochemistry* 37 (6): 659-664, 2002.

Yasuko Sakihama, Michael F. Cohen, Stephen C. Grace and Hideo Yamasaki: Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177: 67-80, 2002.

Ye X. Krohn R.L. Lui W. Joshi S.S. Kuszynski C.A. McGinn T.R. Bagchi M. Preuss, H.G. Stohs S.G. and Bagchi D.: The cytotoxic effects of novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells. *Mol. Cell Biochem.* 196: 99-108, 1999.

Yun-Zhong Fang, Sheng Yang and Guoyao Wu PhD: Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18 (10): 872-879, 2002.

Yusuf Yilmaz and Romeo T. Toledo: Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in Food Science & Technology* 15: 422-433, 2004.

Zhao J., Wang J., Chen Y. and Agarwal R.: Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis* 20: 1737-1745, 1999.